

PATENT APPLICATION

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

RECEIVED

OCT 17 2000

In re application of:

Hideaki TADA et al.

Appln. No.: 09/380,276

Filed: August 27, 1999

For: NOVEL POLYPEPTIDES, DNAs ENCODING THE POLYPEPTIDES, AND  
UTILITY OF THE POLYPEPTIDES



Group Art Unit: 1646

Examiner:

#3  
MQJ  
10/27/00

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

Sir:

Submitted herewith is a certified copy of the priority document on which a claim to  
priority was made under 35 U.S.C. § 119. The Examiner is respectfully requested to  
acknowledge receipt of said priority document.

Respectfully submitted,

SUGHRUE, MION, ZINN,  
MACPEAK & SEAS, PLLC  
2100 Pennsylvania Avenue, N.W.  
Washington, D.C. 20037-3213  
Telephone: (202) 293-7060  
Facsimile: (202) 293-7860

*John Callahan* Reg. No. 32,607  
for Mark Boland  
Registration No. 32,197

Enclosures: Japan Hei. 9-43143

Date: October 13, 2000

RECEIVED

OCT 17 2000

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

D E C L A R A T I O N



I, Tetsuya Kato, declare:

1. That I am a Japanese subject, residing at c/o Minase Research Institute, Ono Pharmaceutical Co., Ltd., 1-1, Sakurai 3-chome, Shimamoto-cho, Mishima-gun, OSAKA, JAPAN.
2. That I am well acquainted with the Japanese and English languages.
3. That the attached is true translation into the English language of the accompanying certified copy of the Application for Patent filed in Japan on February 27th, 1997, under the number Heisei 9-043143.
4. That all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements are made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code, and that such willful false statements may jeopardize the validity of the Patent Application the United States of America of any patent issuing thereon.

Dated this 27th day of August, 1999.

  
Tetsuya Kato

Translation:



Patent Office  
Japanese Government

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application  
as filed this Office.

Date of Application : February 27th, 1997  
Application number : Patent Application No. Heisei 9-043143  
Applicant(s) : Ono Pharmaceutical Co., Ltd.

Dated this 6th March, 1998

Hisamitsu Arai

-----  
Commissioner,

Patent Office

Certificate No. Patent Heisei

10-3011332

Document Name: Application for Patent

Reference No.: ONF2260

Submitted date: 27th February, 1997

Direction: Hisamitsu Arai  
Commissioner, Patent Office

IPC: C07K 14/525

Title of the Invention:

A novel polypeptide, a method of producing it, a DNA encoding it,  
a vector containing it, a host cell transformed with the vector,  
an antibody of the peptide, a pharmaceutical composition  
containing the polypeptide or the antibody

Number of claims: 10

Inventor:

Address: c/o Minase Research Institute Ono Pharmaceutical Co.,  
Ltd. 3-1-1, Sakurai, Shimamoto-cho, Mishima-gun, Osaka

Name: Hideaki TADA

Inventor:

Address: c/o Minase Research Institute Ono Pharmaceutical Co.,  
Ltd. 3-1-1, Sakurai, Shimamoto-cho, Mishima-gun, Osaka

Name: Mikio KONISHI

Inventor:

Address: c/o Minase Research Institute Ono Pharmaceutical Co.,  
Ltd. 3-1-1, Sakurai, Shimamoto-cho, Mishima-gun, Osaka

Name: Daikichi FUKUSHIMA

Applicant:

Discrimination Number: 000185983  
Zip Code: 541  
Address: 1-5, Doshomachi 2-chome, Chuo-ku, Osaka, Osaka  
Name: Ono Pharmaceutical Co., Ltd.  
Representative: Toshio Ueno

Representative:

Discrimination Number: 100081086  
Zip Code: 103  
Address: OHIE Patent Office, Horiguchi No. 2 Bldg. 7F, 2-6,  
Nihonbashi-Ningyocho 2-chome, Chuo-ku, TOKYO

Attorney:

Name: Kunihisa OHIE  
Phone: 03(3669)7714

Charge:

No. of Ledger: 043731  
Sum of prepaid: 21000

List of Attached Documents:

Item:	Specification	1
Item:	Drawing	1
Item:	Abstract	1

Inclusive Power of Attorney No.: 9006202

Proof: Yes

Document Name: Specification

Title of the Invention:

A novel polypeptide, a method of producing it, a DNA encoding it, a vector containing it, a host cell transformed with the vector, an antibody of the peptide, a pharmaceutical composition containing the polypeptide or the antibody

Claims:

1. Substantially purified form of the polypeptide that comprising the amino-acid sequence shown in SEQ ID NO. 1 or 5, homologue thereof, fragment thereof or homologue of the fragment.
2. A polypeptide according to claim 1 that comprising the amino-acid sequence shown in SEQ ID NO. 1 or 5.
3. A cDNA encoding the polypeptide according to claim 1.
4. A cDNA according to claim 3 that comprising the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO. 2 or 6 or a fragment cDNA selectively hybridized to the cDNA.
5. A cDNA according to claim 3 that comprising the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO. 3 or 8 or a fragment cDNA selectively hybridized to the cDNA.
6. A replication or expression vector carrying the cDNA according to claim 3 to 5.
7. A host cell transformed with the replication or expression vector according to claim 6.
8. A method for producing the polypeptide according to claim 1 or 2 which comprises culturing a host cell according to claim 7 under a condition effective to express the polypeptide according to claim 1 or 2.

9. A monoclonal or polyclonal antibody against the polypeptide according to claim 1 or 2.

10. A pharmaceutical composition containing the polypeptide according to claim 1 or 2 or the antibody according to claim 9, in association with pharmaceutically acceptable diluent and/or carrier.

## Detailed Description of the Invention

### Technical Field of the Invention

The invention is related to novel polypeptides produced by a certain human stromal cell line and DNAs encoding the said polypeptides.

More particularly, the invention is related to novel polypeptides named to OAF065 $\alpha$  and OAF065 $\alpha$  (called them OAF065s hereafter), a process for the preparation them, DNAs encoding the said polypeptides, a vector containing the polypeptide, a host cell transformed by the vector, antibody of the said polypeptide, a pharmaceutical composition containing the polypeptide or antibody.

### Background of the Invention

It is known that bone marrow stromal cells form bone marrow micro environment of immunologic, hematopoietic system etc, and they produce and secret essential factors to induce of proliferation and differentiation of stem cells, e.g. IL-7, SCF, IL-11, M-CSF, G-CSF, GM-CSF, IL-6, TGF- $\alpha$ , LIF etc. It is also made clear that a certain bone marrow stromal cells are related to bone metabolism (Kenneth Dorshkind Annu. Rev. Immunol. 8, 111-137. 1990). However, roles of stromal cell are not reconstituted completely from only isolated factors yet. It may suggest that existence of any factors which are not isolated yet.

### Purpose of the Invention

The present inventors have directed their attention to this point and energetic research has been carried out in order to find novel factors



(polypeptides) especially secretory and membrane protein which are generated by a certain stromal cells.

Until now, when a man skilled in the art intends to obtain a particular polypeptide or a DNA encoding it, he generally utilizes methods by confirming an intended biological activity in a tissue or in a cell medium, isolating and purifying the polypeptide and then cloning a gene or methods by "expression-cloning" with the guidance of the biological activity.

However, physiologically active polypeptides in living body have often many kinds of activities. Therefore, it is increasing that after a gene is cloned, the gene is found to be identical to that encoding a polypeptide already known. Generally bone marrow stromal cell generates only a very slight amount of a factor and it makes difficult to isolate and to purify the factor and to confirm its biological activity.

Recent rapid developments in techniques for constructing cDNAs and sequencing techniques have made it possible to quickly sequence a large amount of cDNAs. By utilizing these techniques, a process, which comprises constructing cDNAs at random, identifying the nucleotide sequences thereof, expressing novel polypeptides encoded by them, is now in progress. Although this process is advantageous in that a gene can be cloned and information regarding its nucleotide sequence can be obtained without any biochemical or genetic analysis, the target gene can be discovered thereby only accidentally in many cases.

The present inventors have studied cloning method of genes coding proliferation and/or differentiation factors functioning in hematopoietic systems and immune systems. Focusing their attention on the fact that most of the secretory

proteins such as proliferation and/or differentiation factors (for example various cytokines) and membrane proteins such as receptors thereof (hereafter these proteins will be referred to generally as secretory proteins and the like) have sequences called signal peptides in the N-termini, the inventors conducted extensive studies on a process for efficiently and selectively cloning a gene coding for a signal peptide. Finally, we have successfully invented a screening method for cDNAs having sequence encoding signal peptides, we called the method as signal sequence trap (SST) (See Japanese Patent Application No. 6-13951). We also developed yeast SST method on the same concept. By the method using yeast, genes including sequence encoding signal peptide can be identified more easily and effectively (See USP No. 5,536,637).

By using SST method, the present inventors achieved to find novel membrane proteins produced by bone marrow stromal cell and DNAs encoding them, and we then completed the invention.

The polypeptide OAF065s of the invention are not known one, when amino acid sequences of the polypeptide was compared by a computer to all known sequences in data base of Swiss Prot Release 33.

It was found out that the polypeptides of the invention are type-I membrane protein and they have extracellular Cys rich region which commonly exists in the receptor family of Tumor necrosis factor (TNF) (See Fig. 1). So it was suggested that the polypeptides of the invention are novel membrane proteins which belong to TNF receptor family.

#### Construction of the Invention

The invention provides:

- 1) a polypeptide comprising an amino acid sequence shown in SEQ ID NO. 1 or NO. 5,
- 2) a DNA encoding the polypeptides described above (1),
- 3) a DNA comprising a nucleotide sequence shown in SEQ ID NO. 2 or NO. 6,
- 4) a DNA comprising a nucleotide sequence shown in SEQ ID NO. 3 or NO. 7.

More particularly, the invention is concerned with a polypeptide comprising amino acid sequence shown in SEQ ID NO. 1 or 5 in substantially purified form, a homologue thereof, a fragment of the sequence and a homologue of the fragment.

Further, the invention is concerned with DNAs encoding the above peptides. More particularly the invention is provided DNAs comprising nucleotide sequence shown in SEQ ID NO. 2, 3, 6 or 7, and DNA containing a fragment which is selectively hybridizing to the DNA comprising nucleotide sequence shown in SEQ ID NO. 2, 3, 6, or 7.

A polypeptide comprising amino acid sequence shown in SEQ ID NO. 1 or 5 in substantially purified form will generally comprise the polypeptide in a preparation in which more than 90%, e.g. 95%, 98% or 99% of the polypeptide in the preparation is that of the SEQ ID NO. 1 or 5.

A homologue of polypeptide comprising amino acid sequence shown in SEQ ID NO. 1 or 5 will be generally at least 70%, preferably at least 80 or 90% and more preferably at least 95% homologous to the polypeptide comprising amino acid

sequence shown in SEQ ID NO. 1 over a region of at least 20, preferably at least 30, for instance 40, 60 or 100 more contiguous amino acids. Such a polypeptide homologue will be referred to a polypeptide of the invention.

Generally, a fragment of polypeptide comprising amino acid sequence shown in SEQ ID NO. 1 or 5 or its homologues will be at least 10, preferably at least 15, for example 20, 25, 30, 40, 50 or 60 amino acids in length, and are also referred to by the term "a polypeptide of the invention".

A DNA capable of selectively hybridizing to the DNA comprising nucleotide sequence shown in SEQ ID NO. 2, 3, 6 or 7 will be generally at least 70%, preferably at least 80 or 90% and more preferably at least 95% homologous to the DNA comprising nucleotide sequence shown in SEQ ID NO. 2, 3, 6 or 7 over a region of at least 20, preferably at least 30, for instance 40, 60 or 100 or more contiguous nucleotides. Such DNA will be referred to "a cDNA of the invention".

Fragments of the DNA comprising nucleotide sequence shown in SEQ ID NO. 2, 3, 6 or 7 will be at least 10, preferably at least 15, for example 20, 25, 30 or 40 nucleotides in length, and will be also referred to "a DNA of the invention" as used herein.

A further embodiment of the invention provides replication and expression vectors carrying DNA of the invention. The vectors may be, for example, plasmid, virus or phage vectors provided with an origin of replication, optionally a promoter for the expression of the said DNA and optionally a regulator of the promoter. The vector may contain one or more selectable marker genes, for example a ampicillin resistance gene. The vector may be used in vitro, for example of the production of RNA corresponding to the cDNA, or used to transfect or transfect a host cell.

A further embodiment of the invention provides host cells transformed with the vectors for the replication and expression of the DNA of the invention, including the DNA SEQ ID NO. 2, 3, 6 or 7 or the open reading frame thereof. The cells will be chosen to be compatible with the vector and may for example be bacterial, yeast, insect or mammalian.

A further embodiment of the invention provides a method of producing a polypeptide which comprises culturing host cells of the invention under conditions effective to express a polypeptide of the invention. Preferably, in addition, such a method is carried out under conditions in which the polypeptide of the invention is expressed and then produced from the host cells.

DNA of the invention may also be inserted into the vectors described above in an antisense orientation in order to provide for the production of antisense RNA. Such antisense RNA may be used in a method of controlling the levels of a polypeptide of the invention in a cell.

The invention also provides monoclonal or polyclonal antibodies against a polypeptide of the invention. The invention further provides a process for the production of monoclonal or polyclonal antibodies to the polypeptides of the invention. Monoclonal antibodies may be prepared by common hybridoma technology using polypeptides of the invention or fragments thereof, as an immunogen. Polyclonal antibodies may also be prepared by common means which comprise inoculating host animals, for example a rat or a rabbit, with polypeptides of the invention and recovering immune serum.

The invention also provides pharmaceutical compositions containing a polypeptide of the invention, or an antibody thereof, in association with a

pharmaceutically acceptable diluent and/or carrier.

The polypeptide of the invention includes that which a part of their amino acid sequence is lacking (e.g., a polypeptide comprised of the only essential sequence for revealing a biological activity in an amino acid sequence shown in SEQ ID NO.1), that which a part of their amino acid sequence is replaced by other amino acids (e.g., those replaced by an amino acid having a similar property) and that which other amino acids are added or inserted into a part of their amino acid sequence, as well as those comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO. 1 or 5.

As known well, there are one to six kinds of codon as that encoding one amino acid (for example, one kind of codon for Methioine (Met), and six kinds of codon for leucine (Leu) are known). Accordingly, the nucleotide sequence of DNA can be changed in order to encode the polypeptide having the same amino acid sequence.

The DNA of the invention, specified in (2) includes a group of every nucleotide sequences encoding polypeptides (1) shown in SEQ ID NO. 1 or 5. There is a probability that yield of a polypeptide is improved by changing a nucleotide sequence.

The DNA specified in (3) is the embodiment of the DNA shown in (2), and indicate the sequence of natural form.

The DNA shown in (4) indicates the sequence of the DNA specified in (3) with natural non-translational region.

cDNA carrying nucleotide sequence shown in SEQ ID NO. 3 is prepared by the following method:

Brief description of Yeast SST method (see USP No. 5,536,637) is as follows.

Yeast such as *Saccharomyces cerevisiae* should secrete invertase into the medium in order to take sucrose or raffinose as a source of energy or carbon (Invertase is an enzyme to cleave raffinose into sucrose and melibiose, sucrose into fructose and glucose.). It is known that many known mammalian signal sequence make yeast secrete its invertase. From these knowledge, SST method was developed as a screening method to find novel signal sequence which make it possible can to secrete yeast invertase from mammalian cDNA library. SST method uses yeast growth on raffinose medium as a marker. Non-secretory type invertase gene SUC2 (GENBANK Accession No. V 01311) lacking initiation codon ATG was inserted to yeast expression vector to prepare yeast SST vector pSUC2. In this expression vector, ADH promoter, ADH terminator (both were derived from AAH5 plasmid (Gammerer, Methods in Enzymol. 101, 192-201, 1983)), 2 $\mu$  ori (as a yeast replication origin), TRP1 (as a yeast selective marker), Cole1 ori (as a E. Coli replication origin) and ampicillin resistance gene (as a drug resistance marker) were inserted. Mammalian cDNA was inserted into the upstream of SUC2 gene to prepare yeast SST cDNA library. Yeast lacking secretory type invertase, was transformed with this library. If inserted mammalian cDNA encodes a signal peptide, yeast could be survive in raffinose medium as a result of restoring secretion of invertase. Only to culture yeast colonies, prepare plasmids and determine the nucleotide sequence of the insert cDNAs, it is possible to identify novel signal peptide rapidly and easily.

Preparation of yeast SST cDNA library is as follows:

- (1) mRNA is isolated from the targeted cells, second-strand synthesis is performed

by using random primer with certain restriction enzyme (enzyme I) recognition site,  
(2) double-strand cDNA is ligated to adapter containing certain restriction endonuclease (enzyme II) recognition site, differ from enzyme I, digested with enzyme I and fractionated in a appropriate size,  
(3) obtained cDNA fragment is inserted into yeast expression vector on the upstream region of invertase gene which signal peptide is deleted and the library was transformed.

Detailed description of each step is as follows:

(1) mRNA is isolated from mammalian organs and cell lines stimulate them with appropriate stimulator if necessary) by known methods (Molecular Cloning (Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) or Current Protocol in Molecular Biology (F. M. Ausubel et al, John Wiley & Sons, Inc.) if not remark especially).

HAS303 (human bone marrow stromal cell line: provide from Professor Keisuke Sotoyama, Dr. Makoto Aizawa of Tokyo Medical College, 1st medicine; see J. Cell. Physiol., 148, 245-251, 1991 and Experimental Hematol., 22, 482-487, 1994) and HUVEC (human umbilical vein cord endothelial cell: ATCC No. CRL-1730) are chosen as a tissue source. Double-strand cDNA synthesis using random primer is performed by known methods.

Any sites may be used as restriction endonuclease recognition site I which is linked to adapter and restriction endonuclease recognition site II which is used in step (2), if both sites are different each other. Preferably, EcoRI is used as enzyme I and XhoI as enzyme II.

In step (2), cDNA is created blunt-ends with T4 DNA polymerase, ligated



enzyme II adapter and digested with enzyme I. Fragment cDNA is analyzed with agarose-gel electrophoresis (AGE) and is selected cDNA fraction ranging in size from 300 to 800 bp. As mentioned above, any enzyme may be used as enzyme II if it is not same the enzyme I.

In step (3), cDNA fragment obtained in step (2) is inserted into yeast expression vector on the upstream region of invertase gene which signal peptide is deleted. *E. coli* transformed with the expression vector. Many vectors are known as yeast expression plasmid vector. For example, YEp24 is also functioned in *E. Coli*. Preferably pSUC2 as described above is used.

Many host *E. Coli* strains are known for transformation, preferably DH10B competent cell is used. Any known transformation method is available, preferably it is performed by electroporation method. Transformant is cultured by conventional methods to obtain cDNA library for yeast SST method.

However not every All of the clones do not contain cDNA fragment. Further all of the gene fragments do not encode unknown signal peptides. It is therefore necessary to screen a gene fragment encoding for an unknown signal peptide from the library.

Therefore, screening of fragments containing a sequence encoding an appropriate signal peptide is performed by transformation of the cDNA library into *Saccharomyces cerevisiae* (e.g. Y455 strain) which lack invertase (it may be prepared by known methods.). Transformation of yeast is performed by known methods, e.g. lithium acetate method. Transformant is cultured in a selective medium, then transferred to a medium containing raffinose as a carbon source. Survival colonies are selected and then prepared plasmid. Survival colonies on a raffinose-medium

indicates that some signal peptide of secretory protein was inserted to this clone.

Isolated positive clones is determined the nucleotide sequence. As to a cDNA encodes unknown protein, full-length clone may be isolated by using cDNA fragment as a probe and then determined to obtain full-length nucleotide sequence. These manipulation is performed by known methods.

Once the nucleotide sequences shown in SEQ ID NO. 2, 3, 6 or 7 are determined partially or preferably fully, it is possible to obtain DNA encode mammalian protein itself, homologue or subset. cDNA library or mRNA derived from mammals was screened by PCR with any synthesized oligonucleotide primers or by hybridization with any fragment as a probe. It is possible to obtain DNA encodes other mammalian homologue protein from other mammalian cDNA or genome library.

If a cDNA obtained above contains a nucleotide sequence of cDNA fragment obtained by SST (or consensus sequence thereof), it will be thought that the cDNA encodes signal peptide. So it is clear that the cDNA will be full-length or almost full. (All signal sequences exist at N-termini of a protein and are encoded at 5'-temini of open reading frame of cDNA.)

The confirmation may be carried out by Northern analysis with the said cDNA as a probe. It is thought that the cDNA is almost complete length, if length of the cDNA is almost the same length of the mRNA obtained in the hybridizing band.

Once the nucleotide sequences shown in SEQ ID NOs. 2, 3, 6 or 7 are determined, DNAs of the invention are obtained by chemical synthesis, or by hybridization making use of nucleotide fragments which are chemically synthesized as a probe. Furthermore, DNAs of the invention are obtained in desired amount by transforming a vector that contains the DNA into a proper host, and culturing the

transformant.

The polypeptides of the invention may be prepared by:

- (1) isolating and purifying from an organism or a cultured cell,
  - (2) chemically synthesizing, or
  - (3) using recombinant DNA technology,
- preferably, by the method described in (3) in an industrial production.

Examples of expression system (host-vector system) for producing a polypeptide by using recombinant DNA technology are the expression systems of bacteria, yeast, insect cells and mammalian cells.

In the expression of the polypeptide, for example, in *E. Coli*, the expression vector is prepared by adding the initiation codon (ATG) to 5' end of a DNA encoding mature peptide, connecting the DNA thus obtained to the downstream of a proper promoter (e.g., trp promoter, lac promoter,  $\lambda$  PL promoter, T7 promoter etc.), and then inserting it into a vector (e.g., pBR322, pUC18, pUC19 etc.) which functions in an *E. coli* strain.

Then, an *E. coli* strain (e.g., *E. coli* DH1 strain, *E. coli* JM109 strain, *E. coli* HB101 strain, etc.) which is transformed with the expression vector described above may be cultured in a appropriate medium to obtain the desired polypeptide. When a signal peptide of bacteria (e.g., signal peptide of pel B) is utilized, the desired polypeptide may be also released in periplasm. Furthermore, a fusion protein with other polypeptide may be also produced easily.

In the expression of the polypeptide, for example, in a mammalian cells, for example, the expression vector is prepared by inserting the DNA encoding nucleotide shown in SEQ ID NO. 3 or 7 into the downstream of a proper promoter (e.g.,

SV40 promoter, LTR promoter, metallothionein promoter etc.) in a proper vector (e.g., retrovirus vector, papilloma virus vector, vaccinia virus vector, SV40 vector, etc.). A proper mammalian cell (e.g., monkey COS-7 cell, Chinese hamster CHO cell, mouse L cell etc.) is transformed with the expression vector thus obtained, and then the transformant is cultured in a proper medium to get a desired polypeptide on the cell membrane. A vector described above can be inserted with deletion mutant DNA that encodes sequence, which is deleted transmembrane region from SEQ ID NOs. 3 or 7 and the expression vector can be transfected into an appropriate mammalian cell. The aimed soluble protein can be secreted into the culture medium. The polypeptide available by the way described above can be isolated and purified by conventional biochemical method.

#### Effect of the Invention

The polypeptide OAF065s of the invention show significant homology with a series of proteins which belong to TNF receptor family. Proteins, which belong to TNF receptor family, are type-1 membrane protein which have 3 to 6 repeated structure containing 6 Cys residues in the extracellular domain. It has been apparent that the proteins are related to proliferation, differentiation cell death of various cells by the interaction with ligand thereof (Craig A. Smith et. al., Cell, 76, 959-962, 1994) .

For instance, Neuronal growth factor (NGF) receptor / NGF are essential for keeping several kinds of neuronal cells surviving, allowing neuronal tubes to elongate and promoting to make neuronal transmitters (Chao M.V., J. Neurobiol., 25, 1373-1385, 1994) . Fas/FasL is essential for maintaining homeostasis in vivo,

such as destruction of cancer cells and removal of auto-reactive lymphocytes via its apoptosis-inducing activity, and also relates to CD4-positive T cell reduction in AIDS, fulminant hepatitis, graft versus host disease (GVHD) after transplantation and the onset of various autoimmune diseases (Nagata S. et. al., Science, 267, 1449-1456, 1995). CD40/CD40L is essential for activating B cells (acceleration of growth and antibody production) via T/B cell interaction (Banchereau J. et. al., Annu. Rev. Immunol., 12, 881-922, 1994). TNF receptor/TNF and lymphotoxin (LT) receptor/LT have activities, such as growth, activation and differentiation induction of various immune and hematopoietic cells, cytotoxicity and growth inhibition of tumor cells, growth and activation of various connective tissues (e.g., endothelial cells, fibroblasts, osteoblasts, etc.) and viral growth inhibition, and are also essential for the morphology or organ formation of lymphoid tissue (Ware C.F. et al., Curr. Topics Microbiol. Immunol., 198, 175-218, 1995).

Since repetitive structures of Cys are present at three points in the extracellular domain of the polypeptide of the invention, it is obvious that this is a novel protein belonging to the TNF receptor family and exerts its activity via a ligand belonging to a known or unknown TNF family. In consequence, it is considered that the polypeptide of the invention will show biological activities concerning differentiation, proliferation, growth, survival or cell death of hematopoietic, immune and nerve system cells, concerning immune system functions, concerning proliferation and growth of tumor, concerning inflammations, concerning bone metabolism.

The polypeptide of the invention is suspected to have following functions by itself or interaction with its ligands or receptors or association with other

molecules. For example, proliferation or cell death of B cells, T cells and/or mast cells or class specific induction of B cells by promotion of class switch of immunoglobulin genes; differentiation of B cells to antibody-forming cells; proliferation, differentiation, or cell death of precursors of granulocytes; proliferation, differentiation, or cell death of precursors of monocytes-macrophages; proliferation, of up regulation or cell death of neutrophils, monocytes-macrophages, eosinophils and/or basophils; proliferation, or cell death of precursors of megakaryocytes; proliferation, differentiation, or cell death of precursors of neutrophils; proliferation, differentiation, or cell death of precursors of T cells and B cells; promotion of production of erythrocytes; sustainment of proliferation of erythrocytes, neutrophils, eosinophils, basophils, monocytes-macrophages, mast cells, precursors of megakaryocyte ; promotion of migration of neutrophils, monocytes-macrophages, B cells and/or T cells; proliferation or cell death of thymocytes; suppression of differentiation of adipocytes; proliferation or cell death of natural killer cells; proliferation or cell death of hematopoietic stem cells; suppression of proliferation of stem cells and each hematopoietic precursor cells; promotion of differentiation from mesenchymal stem cells to osteoblasts or chondrocytes, proliferation or cell death of mesenchymal stem cells, osteoblasts or chondrocytes and promotion of bone absorption by activation of osteoclasts and promotion of differentiation from monocytes to osteoclasts.

This peptide is also suspected to function to nervous system, so expected to have functions below; differentiation to kinds of neurotransmitter-responsive neurons, survival or cell death of these cells; promotion of proliferation or cell

death of glial cells; spread of neural dendrites; survival or cell death of gangriocytes; proliferation, promotion of differentiation, or cell death of astrocytes; proliferation or survival of peripheral neurons; proliferation or cell death of Schwann cells; proliferation, survival or cell death of motoneurons.

Furthermore, in the process of development of early embryonic, this polypeptide is expected to promote or inhibit the organogenesis of epidermis, brain, backbone, and nervous system by induction of ectoderm, that of notochord connective tissues(bone, muscle, tendon), hemocytes, heart, kidney, and genital organs by induction of mesoderm, and that of digestive apparatus (stomach, intestine, liver, pancreas), respiratory apparatus (lung, trachea) by induction of endoderm. In adult, also, this polypeptide is thought to proliferate or inhibit the above organs.

It is known that many family of TNF receptor are expressed as soluble receptor in living body. It also known that soluble receptor inhibits its ligand by binding and trapping. So extracellular domain peptide of the invention itself works as an inhibitor is obvious.

Therefore, this polypeptide itself is expected to be used as an agent for the prevention or treatment of disease of progression or suppression of immune, nervous, or bone metabolic function, hypoplasia or overgrowth of hematopoietic cells: inflammatory disease (rheumatism, ulcerative colitis, etc.), decrease of hematopoietic stem cells after bone marrow transplantation, decrease of leukocytes, platelets, B-cells, or T-cells after radiation exposure or chemotherapeutic dosage against cancer or leukemia, anemia, infectious disease, cancer, leukemia, AIDS, bone metabolic disease(osteoporosis etc.), various degenerative disease (Alzheimer's disease, multiple sclerosis, etc.), or nervous lesion.

In addition, since this polypeptide is thought to induce the differentiation or growth of organs derived from ectoderm, mesoderm, and endoderm, this polypeptide is expected to be an agent for tissue repair (epidermis, bone, muscle, tendon, heart, kidney, stomach, intestine, liver, pancreas, lung, and trachea, etc.).

Quantitation of the polypeptide of the invention in the body can be performed using polyclonal or monoclonal antibodies against the polypeptide of the invention. It can be used the study of relationship between this polypeptide and disease or diagnosis of disease, and so on. Polyclonal and monoclonal antibodies can be prepared using this polypeptide or its fragment as an antigen by conventional methods.

Identification, purification or molecular cloning of known or unknown proteins which bind the polypeptide of the invention (preferably polypeptide of extracellular domain) can be performed using the polypeptide of the invention by, for example, preparation of the affinity-column.

Identification of the downstream signal transmission molecules which interact with the polypeptide of the invention in cytoplasm and molecular cloning of the gene can be performed:

by west-western method using the polypeptide of the invention (preferably polypeptide of transmembrane region or intracellular domain) or by yeast two-hybrid system using the cDNA (preferably cDNA encoding transmembrane region or cytoplasmic domain of the polypeptide).

Agonists/antagonists of this receptor polypeptide and inhibitors between receptor and signal transduction molecules can be screened using the polypeptide



of the invention.

cDNAs of the invention are useful not only the important and essential template for the production of the polypeptide of the invention which is expected to be largely useful, but also be useful for diagnosis or therapy (for example, treatment of gene lacking, treatment to stop the expression of the polypeptide by antisense DNA (RNA)). Genomic DNA may be isolated with the cDNA of the invention, as a probe. As the same manner, a human gene encoding which can be highly homologous to the cDNA of the invention, that is, which encodes a polypeptide highly homologous to the polypeptide of the invention and a gene of animals excluding mouse which can be highly homologous to the cDNA of the invention, also may be isolated.

#### Application to Medicaments

The polypeptide of the invention or the antibody specific for the polypeptide of the invention is administered systemically or topically and in general orally or parenterally for preventing or treating diseases related to incomplete growth or abnormal growth of hematopoietic system cells, acceleration or reduction of nerve system functions or acceleration or reduction of immune system functions, such as inflammatory diseases (e.g., rheumatoid, ulcerative colitis, etc.), cytopenia of hematopoietic stem cells after bone marrow transplantation, cytopenia of leukocytes, platelets, B cells or T cells after radiation treatment or after administration of a chemotherapeutic agent, anemia, infectious diseases, cancer, leukemia, AIDS, and various degenerative diseases (e.g., Alzheimer's disease, multiple sclerosis, etc.), or nerve damage, for preventing or treating metabolic disorder of bones (e.g., osteoporosis, etc.), or for repairing tissues.

Oral administration, intravenous injection and intraventricular administration are preferred.

The doses to be administered depend upon age, body weight, symptom, desired therapeutic effect, route of administration, and duration of the treatment etc. In human adults, one dose per person is generally between 100  $\mu$ g and 100 mg, by oral administration, up to several times per day, and between 10  $\mu$ g and 100 mg, by parenteral administration up to several times per day.

As mentioned above, the doses to be used depend upon various conditions. Therefore, there are cases in which doses lower than or greater than the ranges specified above may be used.

The compounds of the invention, may be administered as solid compositions, liquid compositions or other compositions for oral administration, as injections, liniments or suppositories etc. for parenteral administration.

Solid compositions for oral administration include compressed tablets, pills, capsules, dispersible powders, granules. Capsules include soft or hard capsules.

In such compositions, one or more of the active compound(s) is or are admixed with at least one inert diluent (such as lactose, mannitol, glucose, hydroxypropyl cellulose, microcrystalline cellulose, starch, polyvinylpyrrolidone, magnesium metasilicate aluminate, etc.). The compositions may also comprise, as is normal practice, additional substances other than inert diluents: e.g. lubricating agents (such as magnesium stearate etc.), disintegrating agents (such as cellulose calcium glycolate, etc.), stabilizing agents (such as human serum albumin, lactose etc.), and assisting agents for

dissolving (such as arginine, asparaginic acid etc.).

The tablets or pills may, if desired, be coated with a film of gastric or enteric materials (such as sugar, gelatin, hydroxypropyl cellulose or hydroxypropylmethyl cellulose phthalate, etc.), or be coated with more than two films. And then, coating may include containment within capsules of absorbable materials such as gelatin.

Liquid compositions for oral administration include pharmaceutically-acceptable emulsions, solutions, syrups and elixirs. In such compositions, one or more of the active compound(s) is or are contained in inert diluent(s) commonly used (purified water, ethanol etc.). Besides inert diluents, such compositions may also comprise adjuvants (such as wetting agents, suspending agents, etc.), sweetening agents, flavoring agents, perfuming agents, and preserving agents.

Other compositions for oral administration include spray compositions which may be prepared by known methods and which comprise one or more of the active compound(s). Spray compositions may comprise additional substances other than inert diluents: e.g. stabilizing agents (sodium sulfite etc.), isotonic buffer (sodium chloride, sodium citrate, citric acid, etc.). For preparation of such spray compositions, for example, the method described in the United States Patent No. 2,868,691 or 3,095,355 (herein incorporated in their entireties by reference) may be used.

Injections for parenteral administration include sterile aqueous or non-aqueous solutions, suspensions and emulsions. In such compositions, one or more active compound(s) is or are admixed with at least one inert aqueous diluent(s) (distilled water for injection, physiological salt solution, etc.) or inert

non-aqueous diluents(s)(propylene glycol, polyethylene glycol, olive oil, ethanol, POLYSOLBATE 80 TM , etc.).

Injectons may comprise additional compound other than inert diluents: e.g. preserving agents, wetting agents, emulsifying agents, dispersing agents, stabilizing agent (such as human serum albumin, lactose, etc.), and assisting agents such as assisting agents for dissolving (arginine, asparaginic acid, etc.).

### Examples

The invention are illustrated by the following examples, but not limit the invention.

#### Example

Total RNA was prepared from human bone marrow stromal cell line HAS303 (provided from Professor Keisuke Sotoyama, Dr. Makoto Aizawa, first medicine, Tokyo Medical College; See J. Cell. Physiol., 148 : 245-251 (1991) and Experimental Hematol., 22 : 482-487(1994)) by TRIzol reagent (Trade Mark, GIBCOBRL). Poly(A)RNA was purified from the total RNA by mRNA purification kit (commercial name, Pharmacia).

Double strand cDNA was synthesized by SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (brand name, GIBCOBRL) with above poly(A)RNA as template and random 9mer as primer which was containing XhoI site:

SEQ ID NO. 9

5'-CGA TTG AAT TCT AGA CCT GCC TCG AGN NNN NNN NN-3'

cDNA was ligated EcoRI adapter by DNA ligation kit ver.2 (trade name, Takara

Shuzo; this kit was used in all ligating steps hereafter.) and digested by XhoI. cDNAs were separated by agarose-gel electrophoresis. 300 - 800 bp cDNAs were isolated and were ligated to EcoRI/NotI site of pSUC2 (see US 5,536,637). E. Coli DH10B strain were transformed by pSUC2 with electroporation to obtain yeast SST cDNA library.

Plasmids of the cDNA library were prepared. Yeast YTK12 strain were transformed by the plasmids with lithium acetate method (Current Protocols In Molecular Biology 13.7.1). The transformed yeast were plated on triptphan-free medium (CMD-Try medium) for selection. The plate was incubated for 48 hour at 30 °C. Replica of the colony which is obtained by Accutran Replica Plater (trade name, Schleicher & Schuell) were place YPR plate containing raffinose for carbon source, and the plate was incubated for 14 days at 30 °C.

After 3 days, each colony appeared was streaked on YPR plate again. The plates were incubated for 48 hours at 30 °C. Single colony was inoculated to YPR medium and was incubated for 48 hours at 30 °C. Then plasmids were prepared. Insert cDNA was amplified by PCR with two kind primers which exist end side of cloning site on pSUC2 (sense strand primers were biotinylated). Biotinylated single strand of cDNAs were purified with Dynabeads (trade name, DYNAL) and determined the nucleotide sequences.

Sequencing was performed by Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction with DNA Sequencing kit (trade name, Applied Biosystems Inc.) and sequence was determined by DNA sequencer 373 (Applied Biosystems Inc.). All sequencing hereafter was carried with this method.

The clone named OAF065 is not registered on databases by homology search

of nucleotide sequence and deduced amino acid sequence and so it is cleared that the sequence is novel one. We confirmed that OAF065 contains signal peptide in view of function and structure, by comparison with known peptide which has signal peptide and deduced amino acid sequence. Full length cDNA of OAF065 was isolated by 3'-RACE(Rapid Amplification of cDNA End). Marathon cDNA Amplification Kit(trade name, Clontech) was used in 3'-RACE.

Adaptor-ligated double stranded cDNA was prepared from poly(A)RNA of HAS303 in line with the method of the kit. OAF065 specific primer F3 (28mer):  
SEQ ID NO. 10

5'-AGA AAG ATG GCT TTA AAA GTG CTA CTA G-3'

which included a deduced initiation ATG coden region based on the information of nucleotide sequence by SST was prepared. PCR was performed with the said primer and adapter primer attached in the kit. Two kinds of cDNAs (4.0 kb and 1.5 kb) were amplified and 4.0 kb-cDNA was named OAF065 $\alpha$  and 1.5 kb-cDNA was named OAF065 $\alpha$ .

Two kinds cDNAs were separated with agarose-gel electrophoresis, and to pT7 Blue-2 T-Vector (trade name, Novagen), ligated in and transformed to E. Coli DH5 $\alpha$  and then plasmid was prepared. Nucleotide sequences of 5'-end were determined, and the existance of nucleotide sequence OAF065 specific primer F3 were confirmed in both nucleotide sequences. 5'-End nucleotide sequence (ca 1.7 kb) of OAF065 $\alpha$  and full length nucleotide sequence of OAF065 $\alpha$  were determined and then obtained sequences shown in SEQ ID NOs 3 and 7. Open reading frame was searched and deduced amino acid sequences shown in SEQ ID NO. 1 and 5 were obtained.

Compared with the nucleotide sequences of OAF065 $\alpha$  and OAF065 $\beta$ , nucleotide sequences from 1 to 1290 base were completely same, but sequences downstream from

1291 base had no homology each other. Compared with amino acid sequences of OAF065 $\alpha$  and OAF065 $\beta$ , amino acids from 1 to 415 in N-termini were completely same, only two amino acids in C-termini of OAF065 $\alpha$  were replaced to 8 amino acids (Val Arg Gln Arg Leu Gly Ser Leu) in the sequence of OAF065 $\alpha$ . It was revealed that OAF065 $\alpha$  and OAF065 $\beta$  were novel type-I membrane proteins by hydrophobicity analysis and that the extracellular region and the transmembrane region of both sequences were consistent.

The polypeptide OAF065 $\alpha$  and OAF065 $\beta$  of the invention are not known one, when amino acid sequences of the polypeptide was compared by a computer to all known sequences in data base of Swiss Prot Release 33. Extracellular Cys rich region which commonly exists in the TNF receptor family was identified in the polypeptide of the invention.

That is, compared with amino acid sequences of the polypeptide of the invention (OAF065s) and other members of TNF receptor family i.e. human necrosis factor receptor 1 (hTNFR1), human necrosis factor receptor 2 (hTNFR2), human nerve growth factor receptor (hNGFR), and human Fas (hFas), it was revealed that the polypeptides (OAF065s) of the invention are type-I membrane protein and they have extracellular Cys rich region which commonly exists in the TNF (Tumor necrosis factor) receptor family in Fig. 1.

Therefore, it was confirmed that the polypeptides OAF065 $\alpha$  and OAF065 $\beta$  of the invention are novel membrane proteins which belong to the TNF receptor family.

# SEQUENCE LIST

SEQ ID NO.: 1

Length: 417 amino acid

Type: amino acid

Topology: linear

Molecule type: protein

Sequence

Met Ala Leu Lys Val Leu Leu Glu Gln Glu Lys Thr Phe Phe Thr Leu

1 5 10 15

Leu Val Leu Leu Gly Tyr Leu Ser Cys Lys Val Thr Cys Glu Thr Gly

20 25 30

Asp Cys Arg Gln Gln Glu Phe Arg Asp Arg Ser Gly Asn Cys Val Pro

35 40 45

Cys Asn Gln Cys Gly Pro Gly Met Glu Leu Ser Lys Glu Cys Gly Phe

50 55 60

Gly Tyr Gly Glu Asp Ala Gln Cys Val Thr Cys Arg Leu His Arg Phe

65 70 75 80

Lys Glu Asp Trp Gly Phe Gln Lys Cys Lys Pro Cys Leu Asp Cys Ala

85 90 95

Val Val Asn Arg Phe Gln Lys Ala Asn Cys Ser Ala Thr Ser Asp Ala

100 105 110

Ile Cys Gly Asp Cys Leu Pro Gly Phe Tyr Arg Lys Thr Lys Leu Val

115 120 125

Gly Phe Gln Asp Met Glu Cys Val Pro Cys Gly Asp Pro Pro Pro Pro



130	135	140	
Tyr Glu Pro His Cys Ala Ser Lys Val Asn Leu Val Lys Ile Ala Ser			
145	150	155	160
Thr Ala Ser Ser Pro Arg Asp Thr Ala Leu Ala Ala Val Ile Cys Ser			
	165	170	175
Ala Leu Ala Thr Val Leu Leu Ala Leu Leu Ile Leu Cys Val Ile Tyr			
	180	185	190
Cys Lys Arg Gln Phe Met Glu Lys Lys Pro Ser Trp Ser Leu Arg Ser			
	195	200	205
Gln Asp Ile Gln Tyr Asn Gly Ser Glu Leu Ser Cys Leu Asp Pro Arg			
	210	215	220
Gln Leu His Glu Tyr Ala His Arg Ala Cys Cys Gln Cys Arg Arg Asp			
225	230	235	240
Ser Val Gln Thr Cys Gly Pro Val Arg Leu Leu Pro Ser Met Cys Cys			
	245	250	255
Glu Glu Ala Cys Ser Pro Asn Pro Ala Thr Leu Gly Cys Gly Val His			
	260	265	270
Ser Ala Ala Ser Leu Gln Ala Arg Asn Ala Gly Pro Ala Gly Glu Met			
	275	280	285
Val Pro Thr Phe Phe Gly Ser Leu Thr Gln Ser Ile Cys Gly Glu Phe			
	290	295	300
Ser Asp Ala Trp Pro Leu Met Gln Asn Pro Met Gly Gly Asp Asn Ile			
305	310	315	320
Ser Phe Cys Asp Ser Tyr Pro Glu Leu Thr Gly Glu Asp Ile His Ser			

	325	330	335
Leu Asn Pro Glu Leu Glu Ser Ser Thr Ser Leu Asp Ser Asn Ser Ser			
	340	345	350
Gln Asp Leu Val Gly Gly Ala Val Pro Val Gln Ser His Ser Glu Asn			
	355	360	365
Phe Thr Ala Ala Thr Asp Leu Ser Arg Tyr Asn Asn Thr Leu Val Glu			
	370	375	380
Ser Ala Ser Thr Gln Asp Ala Leu Thr Met Arg Ser Gln Leu Asp Gln			
385	390	395	400
Glu Ser Gly Ala Ile Ile His Pro Ala Thr Gln Thr Ser Leu Gln Glu			
	405	410	415
Ala			

SEQ ID NO.: 2

Length: 1269 base pairs

Type: nucleic acid

Strandness: single

Topology: linear

Molecule type: cDNA to mRNA

Sequence

ATGGCTTTAA AAGTGCTACT AGAACAAGAG AAAACGTTTT TCACTCTTTT AGTATTACTA	60
GGCTATTTGT CATGTAAAGT GACTTGTGAA ACAGGAGACT GTAGACAGCA AGAATTCAGG	120
GATCGGTCTG GAAACTGTGT TCCCTGCAAC CAGTGTGGGC CAGGCATGGA GTTGTCTAAG	180

GAATGTGGCT TCGGCTATGG GGAGGATGCA CAGTGTGTGA CGTGCCGGCT GCACAGGTTC 240  
 AAGGAGGACT GGGGCTTCCA GAAATGCAAG CCCTGTCTGG ACTGCGCAGT GGTGAACCGC 300  
 TTTCAGAAGG CAAATTGTTC AGCCACCAGT GATGCCATCT GCGGGGACTG CTTGCCAGGA 360  
 TTTTATAGGA AGACGAAACT TGTCGGCTTT CAAGACATGG AGTGTGTGCC TTGTGGAGAC 420  
 CCTCCTCCTC CTTACGAACC GCACTGTGCC AGCAAGGTCA ACCTCGTGAA GATCGCGTCC 480  
 ACGGCCTCCA GCCCACGGGA CACGGCGCTG GCTGCCGTTA TCTGCAGCGC TCTGGCCACC 540  
 GTCCTGCTGG CCCTGCTCAT CCTCTGTGTC ATCTATTGTA AGAGACAGTT TATGGAGAAG 600  
 AAACCCAGCT GGTCTCTGCG GTCACAGGAC ATTCAGTACA ACGGCTCTGA GCTGTCGTGT 660  
 CTTGACAGAC CTCAGCTCCA CGAATATGCC CACAGAGCCT GCTGCCAGTG CCGCCGTGAC 720  
 TCAGTGCAGA CCTGCGGGCC GGTGCGCTTG CTCCCATCCA TGTGCTGTGA GGAGGCCTGC 780  
 AGCCCCAACC CGGCGACTCT TGGTTGTGGG GTGCATTCTG CAGCCAGTCT TCAGGCAAGA 840  
 AACGCAGGCC CAGCCGGGGA GATGGTGCCG ACTTTCTTCG GATCCCTCAC GCAGTCCATC 900  
 TGTGGCGAGT TTTCAGATGC CTGGCCTCTG ATGCAGAATC CCATGGGTGG TGACAACATC 960  
 TCTTTTGTG ACTCTTATCC TGAAC TCACT GGAGAAGACA TTCATTCTCT CAATCCAGAA 1020  
 CTTGAAAGCT CAACGTCTTT GGATTCAAAT AGCAGTCAAG ATTTGGTTGG TGGGGCTGTT 1080  
 CCAGTCCAGT CTCATTCTGA AAAC TTTACA GCAGCTACTG ATTTATCTAG ATATAACAAC 1140  
 AACTGGTAG AATCAGCATC AACTCAGGAT GCACTAACTA TGAGAAGCCA GCTAGATCAG 1200  
 GAGAGTGGCG CTATCATCCA CCCAGCCACT CAGACGTCCC TCCAGGTAAG GCAGCGACTG 1260  
 GGTTCCTG 1269

SEQ ID NO.: 3  
 length: 1704 base pairs  
 Type: nucleic acid  
 Strandness: single

Topology: linear

Molecule type: cDNA to mRNA

Sequence

```
GGGAACGTAG AACTCTCCAA CAATAAATAC ATTTGATAAG AAAGATGGCT TTAAAAGTGC 60
TACTAGAACA AGAGAAAACG TTTTTCACCTC TTTTAGTATT ACTAGGCTAT TTGTCATGTA 120
AAGTGACTTG TGAACAGGA GACTGTAGAC AGCAAGAATT CAGGGATCGG TCTGGAAACT 180
GTGTTCCCTG CAACCAGTGT GGGCCAGGCA TGGAGTTGTC TAAGGAATGT GGCTTCGGCT 240
ATGGGGAGGA TGCACAGTGT GTGACGTGCC GGCTGCACAG GTTCAAGGAG GACTGGGGCT 300
TCCAGAAATG CAAGCCCTGT CTGGACTGCG CAGTGGTGAA CCGCTTTCAG AAGGCAAATT 360
GTTTCAGCCAC CAGTGATGCC ATCTGCGGGG ACTGCTTGCC AGGATTTTAT AGGAAGACGA 420
AACTTGTCGG CTTTCAAGAC ATGGAGTGTG TGCCTTGTGG AGACCTCCT CCTCCTTACG 480
AACCGCACTG TGCCAGCAAG GTCAACCTCG TGAAGATCGC GTCCACGGCC TCCAGCCCAC 540
GGGACACGGC GCTGGCTGCC GTTATCTGCA GCGCTCTGGC CACCGTCCTG CTGGCCCTGC 600
TCATCCTCTG TGTCTCTAT TGTAAGAGAC AGTTTATGGA GAAGAAACCC AGCTGGTCTC 660
TGCGGTCACA GGACATTCAG TACAACGGCT CTGAGCTGTC GTGTCTTGAC AGACCTCAGC 720
TCCACGAATA TGCCACAGA GCCTGCTGCC AGTGCCGCCG TGAATCAGT CAGACCTGCG 780
GGCCGGTGCG CTTGCTCCCA TCCATGTGCT GTGAGGAGGC CTGCAGCCCC AACCCGGCGA 840
CTCTTGATTG TGGGGTGCAT TCTGCAGCCA GTCTTCAGGC AAGAAACGCA GGCCAGCCG 900
GGGAGATGGT GCCGACTTTC TTCGGATCCC TCACGCAGTC CATCTGTGGC GAGTTTTTCTC 960
ATGCCTGGCC TCTGATGCAG AATCCCATGG GTGGTGACAA CATCTCTTTT TGTGACTCTT 1020
ATCCTGAACT CACTGGAGAA GACATTCATT CTCTCAATCC AGAACTTGAA AGCTCAACGT 1080
CTTTGGATTG AAATAGCAGT CAAGATTTGG TTGGTGGGGC TGTTCCAGTC CAGTCTCATT 1140
CTGAAAACCT TACAGCAGCT ACTGATTTAT CTAGATATAA CAACACACTG GTAGAATCAG 1200
CATCAACTCA GGATGCACTA ACTATGAGAA GCCAGCTAGA TCAGGAGAGT GCGCTATCA 1260
```

TCCACCCAGC CACTCAGACG TCCCTCCAGG AAGCTTAAAG AACCTGCTTC TTTCTGCAGT 1320  
 AGAAGCGTGT GCTGGAACCC AAAGAGTACT CCTTTGTTAG GCTTATGGAC TGAGCAGTCT 1380  
 GGACCTTGCA TGGCTTCTGG GGCAAAAATA AATCTGAACC AAAGTACGG CATTTGAAGC 1440  
 CTTTCAGCCA GTTGCTTCTG AGCCAGACCA GCTGTAAGCT GAAACCTCAA TGAATAACAA 1500  
 GAAAAGACTC CAGGCCGACT CATGATACTC TGCATCTTTC CTACATGAGA AGCTTCTCTG 1560  
 CCACAAAAGT GACTTCAAAG ACGGATGGGT TGAGCTGGCA GCCTATGAGA TTGTGGACAT 1620  
 ATAACAAGAA ACAGAAATGC CCTCATGCTT ATTTTCATGG TGATTGTGGT TTTACAAGAC 1680  
 TGAAGACCCA GAGTATACTT TTTC 1704

SEQ ID NO.: 4

Length: 1704 base pairs

Type: nucleic acid

Strandness: single

Topology: linear

Molecule type: cDNA to mRNA

Original source:

Organism: Homo Sapiens

Cell line: HAS303

Feature

Name/Key: CDS

Location: 45..1295

Identification method: P

Name/Key: sig peptide

Location: 45..119

Identification method: S

Name/Key: mat peptide

Location: 120..1295

Identification method: S

Sequecne

GGGAACGTAG AACTCTCCAA CAATAAATAC ATTTGATAAG AAAG ATG GCT TTA AAA 56

Met Ala Leu Lys

-25

GTG CTA CTA GAA CAA GAG AAA ACG TTT TTC ACT CTT TTA GTA TTA CTA 104

Val Leu Leu Glu Gln Glu Lys Thr Phe Phe Thr Leu Leu Val Leu Leu

-20

-15

-10

GGC TAT TTG TCA TGT AAA GTG ACT TGT GAA ACA GGA GAC TGT AGA CAG 152

Gly Tyr Leu Ser Cys Lys Val Thr Cys Glu Thr Gly Asp Cys Arg Gln

-5

1

5

10

CAA GAA TTC AGG GAT CGG TCT GGA AAC TGT GTT CCC TGC AAC CAG TGT 200

Gln Glu Phe Arg Asp Arg Ser Gly Asn Cys Val Pro Cys Asn Gln Cys

15

20

25

GGG CCA GGC ATG GAG TTG TCT AAG GAA TGT GGC TTC GGC TAT GGG GAG 248

Gly Pro Gly Met Glu Leu Ser Lys Glu Cys Gly Phe Gly Tyr Gly Glu

30

35

40

GAT GCA CAG TGT GTG ACG TGC CGG CTG CAC AGG TTC AAG GAG GAC TGG 296

Asp Ala Gln Cys Val Thr Cys Arg Leu His Arg Phe Lys Glu Asp Trp

45

50

55

GGC TTC CAG AAA TGC AAG CCC TGT CTG GAC TGC GCA GTG GTG AAC CGC 344

Gly Phe Gln Lys Cys Lys Pro Cys Leu Asp Cys Ala Val Val Asn Arg	
60                                  65                                  70                                  75	
TTT CAG AAG GCA AAT TGT TCA GCC ACC AGT GAT GCC ATC TGC GGG GAC	392
Phe Gln Lys Ala Asn Cys Ser Ala Thr Ser Asp Ala Ile Cys Gly Asp	
80                                  85                                  90	
TGC TTG CCA GGA TTT TAT AGG AAG ACG AAA CTT GTC GGC TTT CAA GAC	440
Cys Leu Pro Gly Phe Tyr Arg Lys Thr Lys Leu Val Gly Phe Gln Asp	
95                                  100                                  105	
ATG GAG TGT GTG CCT TGT GGA GAC CCT CCT CCT CCT TAC GAA CCG CAC	488
Met Glu Cys Val Pro Cys Gly Asp Pro Pro Pro Pro Tyr Glu Pro His	
110                                  115                                  120	
TGT GCC AGC AAG GTC AAC CTC GTG AAG ATC GCG TCC ACG GCC TCC AGC	536
Cys Ala Ser Lys Val Asn Leu Val Lys Ile Ala Ser Thr Ala Ser Ser	
125                                  130                                  135	
CCA CGG GAC ACG GCG CTG GCT GCC GTT ATC TGC AGC GCT CTG GCC ACC	584
Pro Arg Asp Thr Ala Leu Ala Ala Val Ile Cys Ser Ala Leu Ala Thr	
140                                  145                                  150                                  155	
GTC CTG CTG GCC CTG CTC ATC CTC TGT GTC ATC TAT TGT AAG AGA CAG	632
Val Leu Leu Ala Leu Leu Ile Leu Cys Val Ile Tyr Cys Lys Arg Gln	
160                                  165                                  170	
TTT ATG GAG AAG AAA CCC AGC TGG TCT CTG CGG TCA CAG GAC ATT CAG	680
Phe Met Glu Lys Lys Pro Ser Trp Ser Leu Arg Ser Gln Asp Ile Gln	
175                                  180                                  185	
TAC AAC GGC TCT GAG CTG TCG TGT CTT GAC AGA CCT CAG CTC CAC GAA	728

Tyr Asn Gly Ser Glu Leu Ser Cys Leu Asp Rro Arg Gln Leu His Glu	
190	195
200	
TAT GCC CAC AGA GCC TGC TGC CAG TGC CGC CGT GAC TCA GTG CAG ACC	776
Tyr Ala His Arg Ala Cys Cys Gln Cys Arg Arg Asp Ser Val Gln Thr	
205	210
215	
TGC GGG CCG GTG CGC TTG CTC CCA TCC ATG TGC TGT GAG GAG GCC TGC	824
Cys Gly Pro Val Arg Leu Leu Pro Ser Met Cys Cys Glu Glu Ala Cys	
220	225
230	235
AGC CCC AAC CCG GCG ACT CTT GGT TGT GGG GTG CAT TCT GCA GCC AGT	872
Ser Pro Asn Pro Ala Thr Leu Gly Cys Gly Val His Ser Ala Ala Ser	
240	245
250	
CTT CAG GCA AGA AAC GCA GGC CCA GCC GGG GAG ATG GTG CCG ACT TTC	920
Leu Gln Ala Arg Asn Ala Gly Pro Ala Gly Glu Met Val Pro Thr Phe	
255	260
265	
TTC GGA TCC CTC ACG CAG TCC ATC TGT GGC GAG TTT TCA GAT GCC TGG	968
Phe Gly Ser Leu Thr Gln Ser Ile Cys Gly Glu Phe Ser Asp Ala Trp	
270	275
280	
CCT CTG ATG CAG AAT CCC ATG GGT GGT GAC AAC ATC TCT TTT TGT GAC	1016
Pro Leu Met Gln Asn Pro Met Gly Gly Asp Asn Ile Ser Phe Cys Asp	
285	290
295	
TCT TAT CCT GAA CTC ACT GGA GAA GAC ATT CAT TCT CTC AAT CCA GAA	1064
Ser Tyr Pro Glu Leu Thr Gly Glu Asp Ile His Ser Leu Asn Pro Glu	
300	305
310	315
CTT GAA AGC TCA ACG TCT TTG GAT TCA AAT AGC AGT CAA GAT TTG GTT	1112



Leu Glu Ser Ser Thr Ser Leu Asp Ser Asn Ser Ser Gln Asp Leu Val  
 320 325 330  
 GGT GGG GCT GTT CCA GTC CAG TCT CAT TCT GAA AAC TTT ACA GCA GCT 1160  
 Gly Gly Ala Val Pro Val Gln Ser His Ser Glu Asn Phe Thr Ala Ala  
 335 340 345  
 ACT GAT TTA TCT AGA TAT AAC AAC ACA CTG GTA GAA TCA GCA TCA ACT 1208  
 Thr Asp Leu Ser Arg Tyr Asn Asn Thr Leu Val Glu Ser Ala Ser Thr  
 350 355 360  
 CAG GAT GCA CTA ACT ATG AGA AGC CAG CTA GAT CAG GAG AGT GGC GCT 1256  
 Gln Asp Ala Leu Thr Met Arg Ser Gln Leu Asp Gln Glu Ser Gly Ala  
 365 370 375  
 ATC ATC CAC CCA GCC ACT CAG ACG TCC CTC CAG GAA GCT TAAAGAACCT 1305  
 Ile Ile His Pro Ala Thr Gln Thr Ser Leu Gln Glu Ala  
 380 385 390  
 GCTTCTTTCT GCAGTAGAAG CGTGTGCTGG AACCCAAAGA GTACTCCTTT GTTAGGCTTA 1365  
 TGGACTGAGC AGTCTGGACC TTGCATGGCT TCTGGGGCAA AAATAAATCT GAACCAAAC 1425  
 GACGGCATTG GAAGCCTTTC AGCCAGTTGC TTCTGAGCCA GACCAGCTGT AAGCTGAAAC 1485  
 CTCAATGAAT AACAAGAAAA GACTCCAGGC CGACTCATGA TACTCTGCAT CTTTCCTACA 1545  
 TGAGAAGCTT CTCTGCCACA AAAGTGACTT CAAAGACGGA TGGGTTGAGC TGGCAGCCTA 1605  
 TGAGATTGTG GACATATAAC AAGAAACAGA AATGCCCTCA TGCTTATTTT CATGGTGATT 1665  
 GTGGTTTTAC AAGACTGAAG ACCCAGAGTA TACTTTTTC 1704

SEQ ID NO.: 5

Length: 423 amino acids

Type: amino acid

Topology: linear

Molecule type: protein

Sequence

Met Ala Leu Lys Val Leu Leu Glu Gln Glu Lys Thr Phe Phe Thr Leu

1 5 10 15

Leu Val Leu Leu Gly Tyr Leu Ser Cys Lys Val Thr Cys Glu Thr Gly

20 25 30

Asp Cys Arg Gln Gln Glu Phe Arg Asp Arg Ser Gly Asn Cys Val Pro

35 40 45

Cys Asn Gln Cys Gly Pro Gly Met Glu Leu Ser Lys Glu Cys Gly Phe

50 55 60

Gly Tyr Gly Glu Asp Ala Gln Cys Val Thr Cys Arg Leu His Arg Phe

65 70 75 80

Lys Glu Asp Trp Gly Phe Gln Lys Cys Lys Pro Cys Leu Asp Cys Ala

85 90 95

Val Val Asn Arg Phe Gln Lys Ala Asn Cys Ser Ala Thr Ser Asp Ala

100 105 110

Ile Cys Gly Asp Cys Leu Pro Gly Phe Tyr Arg Lys Thr Lys Leu Val

115 120 125

Gly Phe Gln Asp Met Glu Cys Val Pro Cys Gly Asp Pro Pro Pro Pro

130 135 140

Tyr Glu Pro His Cys Ala Ser Lys Val Asn Leu Val Lys Ile Ala Ser

145 150 155 160

Thr Ala Ser Ser Pro Arg Asp Thr Ala Leu Ala Ala Val Ile Cys Ser

165

170

175

Ala Leu Ala Thr Val Leu Leu Ala Leu Leu Ile Leu Cys Val Ile Tyr

180

185

190

Cys Lys Arg Gln Phe Met Glu Lys Lys Pro Ser Trp Ser Leu Arg Ser

195

200

205

Gln Asp Ile Gln Tyr Asn Gly Ser Glu Leu Ser Cys Leu Asp Pro Arg

210

215

220

Gln Leu His Glu Tyr Ala His Arg Ala Cys Cys Gln Cys Arg Arg Asp

225

230

235

240

Ser Val Gln Thr Cys Gly Pro Val Arg Leu Leu Pro Ser Met Cys Cys

245

250

255

Glu Glu Ala Cys Ser Pro Asn Pro Ala Thr Leu Gly Cys Gly Val His

260

265

270

Ser Ala Ala Ser Leu Gln Ala Arg Asn Ala Gly Pro Ala Gly Glu Met

275

280

285

Val Pro Thr Phe Phe Gly Ser Leu Thr Gln Ser Ile Cys Gly Glu Phe

290

295

300

Ser Asp Ala Trp Pro Leu Met Gln Asn Pro Met Gly Gly Asp Asn Ile

305

310

315

320

Ser Phe Cys Asp Ser Tyr Pro Glu Leu Thr Gly Glu Asp Ile His Ser

325

330

335

Leu Asn Pro Glu Leu Glu Ser Ser Thr Ser Leu Asp Ser Asn Ser Ser

340

345

350

Gln Asp Leu Val Gly Gly Ala Val Pro Val Gln Ser His Ser Glu Asn

355

360

365

Phe Thr Ala Ala Thr Asp Leu Ser Arg Tyr Asn Asn Thr Leu Val Glu

370

375

380

Ser Ala Ser Thr Gln Asp Ala Leu Thr Met Arg Ser Gln Leu Asp Gln

385

390

395

400

Glu Ser Gly Ala Ile Ile His Pro Ala Thr Gln Thr Ser Leu Gln Val

405

410

415

Arg Gln Arg Leu Gly Ser Leu

420

SEQ ID NO.: 6

Length: 1269 base pairs

Type: nucleic acid

Strandness: single

Topology: linear

Molecule type: cDNA to mRNA

Sequecne

ATGGCTTTAA AAGTGCTACT AGAACAAGAG AAAACGTTTT TCACTCTTTT AGTATTACTA 60  
GGCTATTTGT CATGTAAAGT GACTTGTGAA ACAGGAGACT GTAGACAGCA AGAATTCAGG 120  
GATCGGTCTG GAAACTGTGT TCCCTGCAAC CAGTGTGGGC CAGGCATGGA GTTGTCTAAG 180  
GAATGTGGCT TCGGCTATGG GGAGGATGCA CAGTGTGTGA CGTGCCGGCT GCACAGGTTC 240  
AAGGAGGACT GGGGCTTCCA GAAATGCAAG CCCTGTCTGG ACTGCGCAGT GGTGAACCGC 300

TTTCAGAAGG CAAATTGTTC AGCCACCAGT GATGCCATCT GCGGGGACTG CTTGCCAGGA 360  
 TTTTATAGGA AGACGAAACT TGTCGGCTTT CAAGACATGG AGTGTGTGCC TTGTGGAGAC 420  
 CCTCCTCCTC CTTACGAACC GCACTGTGCC AGCAAGGTCA ACCTCGTGAA GATCGCGTCC 480  
 ACGGCCTCCA GCCCACGGGA CACGGCGCTG GCTGCCGTTA TCTGCAGCGC TCTGGCCACC 540  
 GTCCTGCTGG CCCTGCTCAT CCTCTGTGTC ATCTATTGTA AGAGACAGTT TATGGAGAAG 600  
 AAACCCAGCT GGTCTCTGCG GTCACAGGAC ATTCAGTACA ACGGCTCTGA GCTGTCGTGT 660  
 CTTGACAGAC CTCAGCTCCA CGAATATGCC CACAGAGCCT GCTGCCAGTG CCGCCGTGAC 720  
 TCAGTGCAGA CCTGCGGGCC GGTGCGCTTG CTCCCATCCA TGTGCTGTGA GGAGGCCTGC 780  
 AGCCCCAACC CGGCGACTCT TGGTTGTGGG GTGCATTCTG CAGCCAGTCT TCAGGCAAGA 840  
 AACGCAGGCC CAGCCGGGGA GATGGTGCCG ACTTTCTTCG GATCCCTCAC GCAGTCCATC 900  
 TGTGGCGAGT TTTCAGATGC CTGGCCTCTG ATGCAGAATC CCATGGGTGG TGACAACATC 960  
 TCTTTTTGTG ACTCTTATCC TGAAC TCACT GGAGAAGACA TTCATTCTCT CAATCCAGAA 1020  
 CTTGAAAGCT CAACGTCTTT GGATTCAAAT AGCAGTCAAG ATTTGGTTGG TGGGGCTGTT 1080  
 CCAGTCCAGT CTCATTCTGA AAAC TTTACA GCAGCTACTG ATTTATCTAG ATATAACAAC 1140  
 AACTGGTAG AATCAGCATC AACTCAGGAT GCACTAACTA TGAGAAGCCA GCTAGATCAG 1200  
 GAGAGTGGCG CTATCATCCA CCCAGCCACT CAGACGTCCC TCCAGGTAAG GCAGCGACTG 1260  
 GGTTCCCTG 1269

SEQ ID NO.: 7  
 Length: 1496 base pairs  
 Type: nucleic acid  
 Strandness: single  
 Topology: linear  
 Molecule type: cDNA to mRNA

# Sequence

GGGAACGTAG AACTCTCCAA CAATAAATAC ATTTGATAAG AAAGATGGCT TTAAAAGTGC 60  
TACTAGAACA AGAGAAAACG TTTTTCACCTC TTTTAGTATT ACTAGGCTAT TTGTCATGTA 120  
AAGTGACTTG TGAAACAGGA GACTGTAGAC AGCAAGAATT CAGGGATCGG TCTGGAAACT 180  
GTGTTCCCTG CAACCAGTGT GGGCCAGGCA TGGAGTTGTC TAAGGAATGT GGCTTCGGCT 240  
ATGGGGAGGA TGCACAGTGT GTGACGTGCC GGCTGCACAG GTTCAAGGAG GACTGGGGCT 300  
TCCAGAAATG CAAGCCCTGT CTGGACTGCG CAGTGGTGAA CCGCTTTCAG AAGGCAAATT 360  
GTTTCAGCCAC CAGTGATGCC ATCTGCGGGG ACTGCTTGCC AGGATTTTAT AGGAAGACGA 420  
AACTTGTCGG CTTTCAAGAC ATGGAGTGTG TGCCTTGTGG AGACCTCCT CCTCCTTACG 480  
AACC GCACTG TGCCAGCAAG GTCAACCTCG TGAAGATCGC GTCCACGGCC TCCAGCCAC 540  
GGGACACGGC GCTGGCTGCC GTTATCTGCA GCGCTCTGGC CACCGTCTCG CTGGCCCTGC 600  
TCATCCTCTG TGTCATCTAT TGTAAGAGAC AGTTTATGGA GAAGAAACCC AGCTGGTCTC 660  
TGCGGTCACA GGACATTCAG TACAACGGCT CTGAGCTGTC GTGTCTTGAC AGACCTCAGC 720  
TCCACGAATA TGCCACAGA GCCTGCTGCC AGTGCCGCCG TGAATCAGTG CAGACCTGCG 780  
GGCCGGTGCG CTTGCTCCCA TCCATGTGCT GTGAGGAGGC CTGCAGCCCC AACC CGGCGA 840  
CTCTTGTTG TGGGGTGCA TCTGCAGCCA GTCTTCAGGC AAGAAACGCA GGCCAGCCG 900  
GGGAGATGGT GCCGACTTTC TTCGGATCCC TCACGCAGTC CATCTGTGGC GAGTTTTCAG 960  
ATGCCTGGCC TCTGATGCAG AATCCCATGG GTGGTGACAA CATCTCTTTT TGTGACTCTT 1020  
ATCCTGAACT CACTGGAGAA GACATTCATT CTCTCAATCC AGAACTTGAA AGCTCAACGT 1080  
CTTTGGATTC AAATAGCAGT CAAGATTTGG TTGGTGGGGC TGTTCAGTC CAGTCTCATT 1140  
CTGAAAACCTT TACAGCAGCT ACTGATTTAT CTAGATATAA CAACACACTG GTAGAATCAG 1200  
CATCAACTCA GGATGCACTA ACTATGAGAA GCCAGCTAGA TCAGGAGAGT GCGCTATCA 1260  
TCCACCCAGC CACTCAGACG TCCCTCCAGG TAAGGCAGCG ACTGGGTTCC CTGTGAACAC 1320  
AGCACTGACT TACAGTAGAT CAGAACTCTG TTCCAGCAT AAGATTTGGG GGAACCTGAT 1380

GAGTTTTTTT TTTGCATCTT TAATAATTTC TTGTATGTTG TAGAGTATGT TTAAAAATAA 1440  
 ATTTCAAGTA TTTTTTTTAA AACTAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA 1496

SEQ ID NO.: 8

Length: 1496 base pairs

Type: nucleic acid

Strandness: single

Topology: linear

Molecule type: cDNA to mRNA

Original source

Organism: Homo Sapiens

Cell line: HAS303

Feature

Name/Key: CDS

Location: 45..1313

Identification method: P

Name/Key: sig peptide

Location: 45..119

Identification method: S

Name/Key: mat peptide

Location: 120..1313

Identification method: S

Sequence

GGGAACGTAG AACTCTCCAA CAATAAATAC ATTTGATAAG AAAG ATG GCT TTA AAA 56

Met Ala Leu Lys

-25

GTG CTA CTA GAA CAA GAG AAA ACG TTT TTC ACT CTT TTA GTA TTA CTA 104

Val Leu Leu Glu Gln Glu Lys Thr Phe Phe Thr Leu Leu Val Leu Leu

-20

-15

-10

GGC TAT TTG TCA TGT AAA GTG ACT TGT GAA ACA GGA GAC TGT AGA CAG 152

Gly Tyr Leu Ser Cys Lys Val Thr Cys Glu Thr Gly Asp Cys Arg Gln

-5

1

5

10

CAA GAA TTC AGG GAT CGG TCT GGA AAC TGT GTT CCC TGC AAC CAG TGT 200

Gln Glu Phe Arg Asp Arg Ser Gly Asn Cys Val Pro Cys Asn Gln Cys

15

20

25

GGG CCA GGC ATG GAG TTG TCT AAG GAA TGT GGC TTC GGC TAT GGG GAG 248

Gly Pro Gly Met Glu Leu Ser Lys Glu Cys Gly Phe Gly Tyr Gly Glu

30

35

40

GAT GCA CAG TGT GTG ACG TGC CGG CTG CAC AGG TTC AAG GAG GAC TGG 296

Asp Ala Gln Cys Val Thr Cys Arg Leu His Arg Phe Lys Glu Asp Trp

45

50

55

GGC TTC CAG AAA TGC AAG CCC TGT CTG GAC TGC GCA GTG GTG AAC CGC 344

Gly Phe Gln Lys Cys Lys Pro Cys Leu Asp Cys Ala Val Val Asn Arg

60

65

70

75

TTT CAG AAG GCA AAT TGT TCA GCC ACC AGT GAT GCC ATC TGC GGG GAC 392

Phe Gln Lys Ala Asn Cys Ser Ala Thr Ser Asp Ala Ile Cys Gly Asp

80

85

90

TGC TTG CCA GGA TTT TAT AGG AAG ACG AAA CTT GTC GGC TTT CAA GAC 440



Cys	Leu	Pro	Gly	Phe	Tyr	Arg	Lys	Thr	Lys	Leu	Val	Gly	Phe	Gln	Asp	
		95						100					105			
ATG	GAG	TGT	GTG	CCT	TGT	GGA	GAC	CCT	CCT	CCT	CCT	TAC	GAA	CCG	CAC	488
Met	Glu	Cys	Val	Pro	Cys	Gly	Asp	Pro	Pro	Pro	Pro	Tyr	Glu	Pro	His	
		110						115					120			
TGT	GCC	AGC	AAG	GTG	AAC	CTC	GTG	AAG	ATC	GCG	TCC	ACG	GCC	TCC	AGC	536
Cys	Ala	Ser	Lys	Val	Asn	Leu	Val	Lys	Ile	Ala	Ser	Thr	Ala	Ser	Ser	
		125						130					135			
CCA	CGG	GAC	ACG	GCG	CTG	GCT	GCC	GTT	ATC	TGC	AGC	GCT	CTG	GCC	ACC	584
Pro	Arg	Asp	Thr	Ala	Leu	Ala	Ala	Val	Ile	Cys	Ser	Ala	Leu	Ala	Thr	
		140						145					150		155	
GTC	CTG	CTG	GCC	CTG	CTC	ATC	CTC	TGT	GTC	ATC	TAT	TGT	AAG	AGA	CAG	632
Val	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Ile	Leu	Cys	Val	Ile	Tyr	Cys	Lys	Arg	Gln	
			160						165					170		
TTT	ATG	GAG	AAG	AAA	CCC	AGC	TGG	TCT	CTG	CGG	TCA	CAG	GAC	ATT	CAG	680
Phe	Met	Glu	Lys	Lys	Pro	Ser	Trp	Ser	Leu	Arg	Ser	Gln	Asp	Ile	Gln	
			175						180					185		
TAC	AAC	GGC	TCT	GAG	CTG	TCG	TGT	CTT	GAC	AGA	CCT	CAG	CTC	CAC	GAA	728
Tyr	Asn	Gly	Ser	Glu	Leu	Ser	Cys	Leu	Asp	Rro	Arg	Gln	Leu	His	Glu	
		190							195				200			
TAT	GCC	CAC	AGA	GCC	TGC	TGC	CAG	TGC	CGC	CGT	GAC	TCA	GTG	CAG	ACC	776
Tyr	Ala	His	Arg	Ala	Cys	Cys	Gln	Cys	Arg	Arg	Asp	Ser	Val	Gln	Thr	
		205							210				215			
TGC	GGG	CCG	GTG	CGC	TTG	CTC	CCA	TCC	ATG	TGC	TGT	GAG	GAG	GCC	TGC	824

Cys Gly Pro Val Arg Leu Leu Pro Ser Met Cys Cys Glu Glu Ala Cys	
220	225
230	235
AGC CCC AAC CCG GCG ACT CTT GGT TGT GGG GTG CAT TCT GCA GCC AGT	872
Ser Pro Asn Pro Ala Thr Leu Gly Cys Gly Val His Ser Ala Ala Ser	
240	245
250	
CTT CAG GCA AGA AAC GCA GGC CCA GCC GGG GAG ATG GTG CCG ACT TTC	920
Leu Gln Ala Arg Asn Ala Gly Pro Ala Gly Glu Met Val Pro Thr Phe	
255	260
265	
TTC GGA TCC CTC ACG CAG TCC ATC TGT GGC GAG TTT TCA GAT GCC TGG	968
Phe Gly Ser Leu Thr Gln Ser Ile Cys Gly Glu Phe Ser Asp Ala Trp	
270	275
280	
CCT CTG ATG CAG AAT CCC ATG GGT GGT GAC AAC ATC TCT TTT TGT GAC	1016
Pro Leu Met Gln Asn Pro Met Gly Gly Asp Asn Ile Ser Phe Cys Asp	
285	290
295	
TCT TAT CCT GAA CTC ACT GGA GAA GAC ATT CAT TCT CTC AAT CCA GAA	1064
Ser Tyr Pro Glu Leu Thr Gly Glu Asp Ile His Ser Leu Asn Pro Glu	
300	305
310	315
CTT GAA AGC TCA ACG TCT TTG GAT TCA AAT AGC AGT CAA GAT TTG GTT	1112
Leu Glu Ser Ser Thr Ser Leu Asp Ser Asn Ser Ser Gln Asp Leu Val	
320	325
330	
GGT GGG GCT GTT CCA GTC CAG TCT CAT TCT GAA AAC TTT ACA GCA GCT	1160
Gly Gly Ala Val Pro Val Gln Ser His Ser Glu Asn Phe Thr Ala Ala	
335	340
345	
ACT GAT TTA TCT AGA TAT AAC AAC ACA CTG GTA GAA TCA GCA TCA ACT	1208

Thr Asp Leu Ser Arg Tyr Asn Asn Thr Leu Val Glu Ser Ala Ser Thr  
 350 355 360  
 CAG GAT GCA CTA ACT ATG AGA AGC CAG CTA GAT CAG GAG AGT GGC GCT 1256  
 Gln Asp Ala Leu Thr Met Arg Ser Gln Leu Asp Gln Glu Ser Gly Ala  
 365 370 375  
 ATC ATC CAC CCA GCC ACT CAG ACG TCC CTC CAG GTA AGG CAG CGA CTG 1304  
 Ile Ile His Pro Ala Thr Gln Thr Ser Leu Gln Val Arg Gln Arg Leu  
 380 385 390 395  
 GGT TCC CTG TGAACACAG CACTGACTTA CAGTAGATCA GAACTCTGTT CCCAGCATAA 1362  
 Gly Ser Leu  
 GATTTGGGGG AACCTGATGA GTTTTTTTTT TGCATCTTTA ATAATTTCTT GTATGTTGTA 1422  
 GAGTATGTTT TAAAATAAAT TTCAAGTATT TTTTTTAAAA ACTAAAAAAA AAAAAAAAAA 1482  
 AAAAAAAAAA AAAA 1496

#### Brief Description of the Drawing

Fig. 1 shows comparison of the amino acid sequence of the invention and that of TNF receptor family. hTNFR1 represents human necrosis factor receptor 1, hTNFR2 represents human necrosis factor receptor 2, hNGFR represents human nerve growth factor receptor, and hFas represents human Fas, in this figure.

Fig. 1

OAF065	1	-----	MALKVLEQE	KTFF--TLLV	LLGYLSCKVT	CETGDCRQQE	38
hTNFR1	1	-MGLSTVPDL	LLPLVLELL	VGIYPSGVIG	LVPHLGDREK	RDSV-CPQ GK	48
hTNFR2	1	----MAPVAV	WAALAVGLEL	WAAA--HALP	AQVAFTPYAP	EPGSTCRLRE	44
hNGFR	1	-----	--MGAGATGR	AMDG--PRLL	LLLLLLGVSLG	GAKEACPTGL	36
hFas	1	MLGIWTLPL	VLTSVARLSS	KSVN--AQVT	DINSKGLELR	KTVTTVETQN	48
*							
OAF065	39	FRDRSGNCVP	CNQ-CGPGME	LSKECGFGYG	EDAQCVTCLRL	HR-FK-EDWG	85
hTNFR1	49	YIHPQNNSIC	CTK-CHKGTY	LYNDGP-GPG	QDTDCRECES	GS-FTASENH	95
hTNFR2	45	YYDQTAQ-MC	CSK-CSPGQH	AKVFC--TKT	SDTVCDSCED	ST-YT-QLWN	88
hNGFR	37	Y-THSGEC--	CKA-CNLGEG	VAQPCGANQT	VCEPCLD-SV	TF-SD-VVSA	79
hFas	49	LEGLHHDGQF	CHKPCPPGER	KARDCTVN-G	DEPDCVPCQE	GKEYT-DKAH	96
* * *							
OAF065	86	F-QKCKPCLD	-CAVNRFRQ-	KANCSATSDA	ICGDCPLPGFY	...	122
hTNFR1	96	L-RHCLSCSK	-CRKEMGQVE	ISSCTVDRDT	VCG-CRKNQY	...	132
hTNFR2	89	WVPECLSCGS	RCSSDQVE--	TQACTREQNR	IC-TCRPGWY	...	125
hNGFR	80	T-EPCKPCTE	-CVGLQSM--	SAPCVEADDA	VC-RCAYGY	...	114
hFas	97	FSSKCRRCRL	-CDEGHGLEV	EINCTRQNT	KC-RCKPNFF	...	134

Document Name: Abstract

Abstract

Constitution

Polypeptide produced from human stromal cell line, the process for the preparation of the polypeptide, DNA encoding the polypeptide, vector carrying the DNA, host cell transformed by the vector, antibody of the polypeptide, and pharmaceutical composition containing the polypeptide or the antibody.

Effect

It is considered that the polypeptide of the invention will show biological activities concerning differentiation, proliferation, growth, survival or cell death of hematopoietic, immune and nerve system cells, concerning immune system functions, concerning proliferation and growth of tumor, concerning inflammations, concerning bone metabolism. Therefore, the polypeptide of the invention is expected to be used as an agent for the prevention or treatment of disease of progression or suppression of immune, nervous, or bone metabolic function, hypoplasia or overgrowth of hematopoietic cells

Figure selected: None

17.03.98

日 本 国 特 許 庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

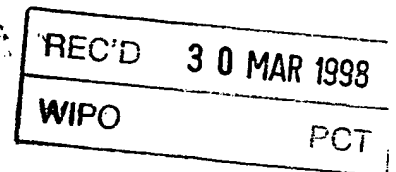
1997年 2月27日

出 願 番 号  
Application Number:

平成 9年特許願第043143号

出 願 人  
Applicant(s):

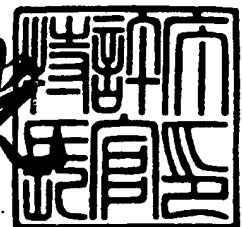
小野薬品工業株式会社



1998年 3月 6日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

荒井寿光



出証番号 出証特平10-3011332

【書類名】 特許願

【整理番号】 ONP2260

【提出日】 平成 9年 2月27日

【あて先】 特許庁長官 荒井 寿光 殿

【国際特許分類】 C07K 14/525

【発明の名称】 新規なポリペプチド、その製造方法、そのポリペプチドをコードするDNA、そのDNAからなるベクター、そのベクターで形質転換された宿主細胞、そのポリペプチドの抗体、およびそのペプチドまたは抗体を含有する薬学的組成物

【請求項の数】 10

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町桜井3丁目1番1号 小野薬品工業株式会社 水無瀬総合研究所内

【氏名】 多田 秀明

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町桜井3丁目1番1号 小野薬品工業株式会社 水無瀬総合研究所内

【氏名】 小西 幹夫

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町桜井3丁目1番1号 小野薬品工業株式会社 水無瀬総合研究所内

【氏名】 福島 大吉

【特許出願人】

【識別番号】 000185983

【郵便番号】 541

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町2丁目1番5号

【氏名又は名称】 小野薬品工業株式会社

【代表者】 上野 利雄

【代理人】

【識別番号】 100081086

【郵便番号】 103

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋人形町2丁目2番6号 堀口第2ビル7階 大家特許事務所

【弁理士】

【氏名又は名称】 大家 邦久

【電話番号】 03(3669)7714

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 043731

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9006202

【プルーフの要否】 要



【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規なポリペプチド、その製造方法、そのポリペプチドをコードするDNA、そのDNAからなるベクター、そのベクターで形質転換された宿主細胞、そのポリペプチドの抗体、およびそのペプチドまたは抗体を含有する薬学的組成物

【特許請求の範囲】

【請求項1】 実質的に純粋な形である配列番号1または5で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、そのホモログ、そのフラグメントまたはそのフラグメントのホモログ。

【請求項2】 配列番号1または5で示されるアミノ酸配列からなる請求項1記載のポリペプチド。

【請求項3】 請求項1に記載されたポリペプチドをコードするDNA。

【請求項4】 配列番号2または6で示される塩基配列を有する請求項3記載のDNA、またはその配列に選択的にハイブリダイズするフラグメント。

【請求項5】 配列番号3または7で示される塩基配列を有する請求項3記載のDNA、またはその配列に選択的にハイブリダイズするフラグメント。

【請求項6】 請求項3から5のいずれかの項に記載のDNAからなる複製または発現ベクター。

【請求項7】 請求項6記載の複製または発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

【請求項8】 請求項1または2に記載されたポリペプチドを発現させるための条件下で請求項7記載の宿主細胞を培養することからなる該ポリペプチドの製造方法。

【請求項9】 請求項1または2に記載されたポリペプチドのモノクローナルまたはポリクローナル抗体。

【請求項10】 請求項1または2に記載されたポリペプチドまたは請求項9記載の抗体および薬学的に許容される賦形剤および／または担体を含有することを特徴とする薬学的組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、ある種のヒストローマ細胞株が産生する新規なポリペプチドおよびそのポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNAに関する。

更に詳細に述べると、ある種のヒストローマ細胞株が産生するOAF065 $\alpha$ およびOAF065 $\beta$ （以下、併せてOAF065という。）と命名された新規なポリペプチド、それらポリペプチドの製造方法、それらポリペプチドをコードするDNA、それらDNAからなるベクター、それらベクターで形質転換された宿主細胞、それらポリペプチドの抗体、およびそれらポリペプチドまたは抗体を含有する薬学的組成物に関する。

## 【0002】

## 【発明の背景】

骨髓ストローマ細胞は、免疫系、造血系等の骨髓微小環境を形作り、それらの幹細胞の増殖分化誘導に欠かせない因子、例えば、IL-7、SCF、IL-11、M-CSF、G-CSF、GM-CSF、IL-6、TGF- $\beta$ 、LIF等の因子を産生、分泌していることが知られている。また、骨髓ストローマ細胞のあるものは、骨代謝に関与することが明かとなっている（Kenneth Dorshkind, *Annu. Rev. Immunol.*, 8, 113-137, 1990参照）。しかしながら、これまでに単離された因子群のみでは、ストローマ細胞の役割を完全に担うことができない。このことは、まだ単離されていない因子が存在することを示唆している。

## 【0003】

## 【発明の目的】

本発明者らは、この点に注目し、ある種のストローマ細胞が産生している新規な因子（ポリペプチド）、特に分泌タンパクおよび膜蛋白質に着目してそれを見出すべく、鋭意検討を行なった。

## 【0004】

従来、ある特定のポリペプチドまたはそれをコードするDNAを得ようとする場合、組織や細胞培養液中に目的とする生物活性を確認し、次いでポリペプチド

の単離精製を経て、遺伝子をクローニングする方法、あるいはその生物活性を指標として遺伝子を発現クローニングする方法が一般的に用いられていた。

しかし、生体内生理活性ポリペプチドは、多様な生物活性を有している場合が多いので、あるひとつの活性を指標にして遺伝子をクローニングした結果、それが既知のポリペプチドと同一であることが後になって判明するという事例が増えている。また、骨髓ストローマ細胞が産生する因子は殆どのものが微量しか産生されず、そのことが単離、精製および生物活性の確認を困難なものとしている。

#### 【0005】

近年、cDNAの作製技術やシーケンス技術は急速に発展し、大量のcDNAのシーケンスを迅速に行なうことができるようになった。そこでこれらの技術を利用して、様々な細胞や組織からcDNAライブラリーを作製し、ランダムにcDNAをクローニングして塩基配列を決定し、相当するポリペプチドを発現させた後、その生理機能を解析していくという方法が発展しつつある。この方法は、生化学的、遺伝子学的な解析を一切必要とせずに遺伝子をクローニングし、その塩基配列の情報を得ることができるという特徴を有しているが、目的とする遺伝子の発見は偶発的要素が大きい。

#### 【0006】

本発明者らは、これまで造血系や免疫系で働く増殖分化因子の遺伝子のクローニングを研究してきた。そして、増殖分化因子（例えば、各種サイトカイン等）のような分泌タンパクやそのレセプターのような膜タンパク（以下、これらをまとめて分泌タンパク等と呼ぶ。）の大部分がそのN末端にシグナルペプチドと呼ばれる配列を有していることに着目して、シグナルペプチドをコードする遺伝子を効率的かつ選択的にクローニングする方法を鋭意検討した。その結果、動物細胞を用いて、シグナルペプチドの有無を簡単に検索できる方法（シグナルシーケンストラップ（SST）法）を見出した（特願平6-13951号参照）。さらに同じ概念のもとに、酵母を用いてさらに大量かつ簡便にシグナルペプチドをコードする遺伝子を単離する方法（酵母SST法）も開発された（米国特許 No. 5,536,637参照）。

本発明者らはSST法を用いて、骨髓ストローマ細胞が産生している新規な膜

タンパク質およびそれをコードするDNAを見出すことに成功し、本発明を完成した。

## 【0007】

アミノ酸配列データベースのスイスプロット (Swiss Prot Release 33) に登録されている既知のポリペプチドのアミノ酸配列を調査した結果、本発明のポリペプチドOAF065は未知であったが、I型の膜蛋白で細胞外領域に腫瘍壊死因子 (Tumor necrosis factor: TNF) 受容体ファミリーに共通するCysリッチ領域を有することが判明した (図1)。このことから、本発明のポリペプチドは、TNF受容体ファミリーに属する新規の膜蛋白であることが示された。

## 【0008】

## 【発明の構成】

本発明は、

- (1) 配列番号1または5で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、
  - (2) 前記(1)に記載したポリペプチドをコードするDNA、
  - (3) 配列番号2または6で示される塩基配列を有するDNA、
  - (4) 配列番号3または7で示される塩基配列を有するDNA、
- に関する。

## 【0009】

さらに詳しく述べると、本発明は、実質的に純粋な形である配列番号1または5で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、そのホモログ、その配列のフラグメントおよびそのホモログに関する。

本発明はさらにそれらのポリペプチドをコードするDNAに関する。より具体的には、配列番号2、3、6または7で示される塩基配列を有するDNA、および配列番号2、3、6または7で示される塩基配列に選択的にハイブリダイズするフラグメントを有するDNAに関する。

## 【0010】

実質的に純粋な形である配列番号1または5で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドとは、一般に、生産時のポリペプチドの90%以上、例えば、95、98または99%が配列番号1または5で示されるアミノ酸配列を有するポリ

ペプチドであることを意味する。

【0011】

配列番号1または5で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのホモログとは、一般に少なくとも20個、好ましくは少なくとも30個、例えば40、60または100個の連続したアミノ酸領域で、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80または90%、より好ましくは95%以上相同性であるものであり、そのようなホモログは、以後本発明のポリペプチドとして記載される。

【0012】

さらに、配列番号1または5で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのフラグメント、またはそれらのホモログのフラグメントとは、少なくとも10アミノ酸、好ましくは少なくとも15アミノ酸、例えば20、25、30、40、50または60アミノ酸部分を意味する。

【0013】

配列番号2、3、6または7で示される塩基配列を有するDNAに選択的にハイブリダイズするDNAとは、一般に、少なくとも20個、好ましくは少なくとも30個、例えば40、60または100個の連続した塩基配列領域で、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80または90%、より好ましくは95%以上相同性であるものであり、そのようなDNAは、以後本発明のDNAとして記載される。

【0014】

配列番号2、3、6または7で示される塩基配列を有するDNAのフラグメントとは、少なくとも10塩基、好ましくは少なくとも15塩基、例えば20、25、30または40塩基部分を意味し、そのようなフラグメントも本発明のDNAに含まれる。

【0015】

さらに、本発明には、本発明のDNAからなる複製または発現ベクターが含まれる。ベクターとしては、例えば、ori領域と、必要により上記DNAの発現のためのプロモーター、プロモーターの制御因子などからなるプラスミド、ウィルスまたはファージベクターが挙げられる。ベクターはひとつまたはそれ以上の

選択的マーカー遺伝子、例えばアンピシリン耐性遺伝子を含んでいてもよい。ベクターは、イン・ビトロ (in vitro) において、例えばDNAに対応するRNAの製造、宿主細胞の形質転換に用いることができる。

## 【0016】

さらに、本発明には、配列番号2、3、6または7で示される塩基配列、またはそれらのオープンリーディングフレームを有するDNAを含む本発明のDNAを複製または発現させるためのベクターで形質転換された宿主細胞も含まれる。細胞としては、例えば細菌、酵母、昆虫細胞または哺乳動物細胞が挙げられる。

## 【0017】

さらに、本発明には、本発明のポリペプチドを発現させるための条件下で、本発明の宿主細胞を培養することからなる本発明のポリペプチドの製造方法も含まれる。培養は、本発明のポリペプチドが発現し、宿主細胞より製造される条件下で行なわれることが好ましい。

## 【0018】

本発明のDNAは、上記のようなベクターのアンチセンス領域に挿入することでアンチセンスRNAを製造することもできる。このようなアンチセンスRNAは、細胞中の本発明のポリペプチドのレベルを制御することに用いることもできる。

## 【0019】

本発明は、本発明のポリペプチドのモノクローナルまたはポリクローナル抗体も含む。さらに本発明のポリペプチドのモノクローナルまたはポリクローナル抗体の製造方法も含む。モノクローナル抗体は、本発明のペプチド、またはその断片を抗原として用い、通常のハイブリドーマの技術により製造することができる。ポリクローナル抗体は、宿主動物（例えば、ラットやウサギ等）に本発明のポリペプチドを接種し、免疫血清を回収する、通常の方法により製造することができる。

## 【0020】

本発明には、本発明のポリペプチド、その抗体と薬学的に許容される賦形剤および／または担体を含有する薬学的組成物も含まれる。

## 【0021】

(1) の本発明のポリペプチドとしては、配列番号1または5で示されたアミノ酸配列を有するもの以外に、その一部が欠損したもの（例えば、配列番号1中、生物活性の発現に必須な部分だけからなるポリペプチド等）、その一部が他のアミノ酸と置換したもの（例えば、物性の類似したアミノ酸に置換したもの）、およびその一部に他のアミノ酸が付加または挿入されたものも含まれる。

よく知られているように、ひとつのアミノ酸をコードするコドンには1～6種類（例えば、Metは1種類、Leuは6種類）知られている。従って、ポリペプチドのアミノ酸配列を変えることなくDNAの塩基配列を変えることができる。

## 【0022】

(2) で特定される本発明のDNAには、(1) の配列番号1または5で示されるポリペプチドをコードするすべての塩基配列群が含まれる。塩基配列を変えることによって、ポリペプチドの生産性が向上することがある。

(3) で特定されるDNAは、(2) で示されるDNAの一態様であり、天然型配列を表わす。

(4) に示されるDNAは、(3) で特定されるDNAに天然の非翻訳部分を加えた配列を示す。

## 【0023】

配列番号3で示される塩基配列を有するDNAの作製は、以下の方法に従って行なわれる。

## 【0024】

はじめに酵母SST法（米国特許 No. 5,536,637に記載）の概要について説明する。

サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) などの酵母がショ糖またはラフィノースをエネルギー源や炭素源として利用するためにはインベルターゼを培地中に分泌しなければならない（インベルターゼはラフィノースをショ糖とメリビオースに、ショ糖をフルクトースとグルコースに分解する酵素である。）。また、数多くの既知の哺乳類のシグナルシーケンスは酵母のインベルターゼを分泌させ得ることが知られている。これらの知見から、酵母のインベ

ルターゼの分泌を可能にする新規のシグナルシーケンスを哺乳類のcDNAライブラリーからラフィノース培地上での酵母の生育を指標にスクリーニングする方法として本方法は開発された。

#### 【0025】

翻訳開始点ATGを削除した非分泌型のインベルターゼ遺伝子SUC2 (GENBANK accession No.V01311) を、酵母の発現ベクター (発現用プロモーター (ADHプロモーター) およびターミネーター (ADHターミネーター) はAAH5プラスミド (Gammerer, Methods in Enzymol., 101,192-201,1983) 由来で、酵母複製起点は2 $\mu$ ori、酵母選択マーカーにはTRP1、大腸菌複製起点はColE1ori、大腸菌薬剤耐性マーカーにはアンピシリンが使用されている。) に組み込んで酵母SST用ベクターpSUC2を作製した。そのSUC2遺伝子の上流に哺乳類のcDNAを組み込んで、酵母SSTcDNAライブラリーを調製した。このライブラリーを分泌型インベルターゼを欠損している酵母に形質転換した。組み込まれた哺乳類cDNAがシグナルシーケンスをコードしている場合、酵母で発現されたインベルターゼに対しても分泌作用をもつと考えられ、その結果ラフィノース培地上での生育が可能となる。よって出現したコロニーから酵母を培養してプラスミドを調製し、インサートDNAの塩基配列を決定することによって、新規シグナルシーケンスの検索を迅速かつ容易にした。

#### 【0026】

酵母SSTcDNAライブラリーの作製は

- (1) 対象となる細胞よりmRNAを単離し、特定の制限酵素 (酵素I) サイトを連結したランダムプライマーを用いて二本鎖DNAを合成し、
- (2) 酵素Iとは異なる特定の制限酵素 (酵素II) サイトを含むアダプターを連結して、酵素Iで消化した後、適当なサイズで分画し、
- (3) 酵母発現ベクター内のシグナルペプチドを削除したインベルターゼ遺伝子の上流に得られたcDNA断片を連結し、形質転換する工程よりなる。

#### 【0027】

各工程を詳しく説明すると、工程(1)では、対象となる哺乳類の臓器や細胞株などより、必要により適当な刺激剤で刺激した後、公知の方法 (以下、公知の



方法は特に記載がなければMolecular Cloning (Sambrook, J., Fritsch, E. F. およびManiatis, T. 著、Cold Spring Harbor Laboratory Pressより1989年に発刊) またはCurrent Protocol in Molecular Biology(F.M.Ausubelら編、John Wiley&Sons, Incより発刊)に記載の方法に従って行なわれる。) に従ってmRNAの単離が行なわれる。

#### 【0028】

対象となる細胞としては、HAS303 (ヒト骨髓ストローマ細胞株：東京医科大学第一内科外山圭助教授、相沢信助手より供与。J.Cell.Physiol., 148, 245-251, 1991およびExperimental Hematol., 22, 482-487, 1994に記載) またはHUVEC (ヒトさい帯静脈血管内皮細胞：ATCC No.CRL-1730) が挙げられる。ランダムプライマーを用いる二本鎖cDNAの合成は公知の方法により行なわれる。

#### 【0029】

アダプターに連結される制限酵素 (酵素I) サイトと次の工程 (2) で用いられる制限酵素 (酵素II) サイトは、互いに異なるものであれば何を用いてもよい。好ましくは、酵素IとしてEcoRI、酵素IIとしてはXhoIが用いられる。

#### 【0030】

工程 (2) ではT4DNAポリメラーゼで末端を平滑化し、酵素IIアダプターを連結した後、酵素Iで消化アガロース電気泳動 (AGE) により300～800bpのcDNAを分画する。酵素IIは、前記したように酵素Iと異なるものなら何でもよい。

#### 【0031】

工程 (3) は、酵母発現用プラスミドベクターに連結されたシグナルペプチドを削除したインベルターゼの遺伝子上流に (2) で得られたcDNA断片を組み込んで大腸菌に形質転換する工程である。ここで酵母発現用プラスミドベクターとしては種々のものが知られているが、例えば、大腸菌内でも機能するYEp24などが用いられる。好適には前述したプラスミドpSUC2が用いられる。

## 【0032】

形質転換のための宿主大腸菌株はすでに多くのものが知られており、好ましくはDH10Bのコンピテントセルである。また形質転換方法は公知のいずれを用いてもよいが、好ましくはエレクトロポレーション法により行なわれる。形質転換体は常法により培養され、酵母SST用のcDNAライブラリーが得られる。

## 【0033】

このcDNAライブラリーは、すべてのクローンが該断片を含んでいる訳ではないし、またすべてが未知の(新規の)シグナルペプチドをコードする遺伝子断片とは限らない。そこで、次に該ライブラリーから未知のシグナルペプチドをコードする遺伝子断片をスクリーニングする必要がある。

## 【0034】

すなわち、cDNAライブラリーをインベルターゼ遺伝子をもたない酵母サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) (例えば、YT455株など) またはインベルターゼ遺伝子を人為的に欠損させた株(公知の方法に従い作製可能)を用いることができる。酵母の形質転換は公知の方法、例えば酢酸リチウム法によって行なわれる。形質転換体を選択培地で生育後、ラフィノースを炭素源とする培地に移し、生育可能なコロニーを選択し、プラスミドを回収する。ラフィノースを炭素源として酵母が生育したということは、ライブラリー中に何らかの分泌タンパクのシグナルペプチドが組み込まれていたことを示している。

## 【0035】

次に、単離した陽性クローンについて、塩基配列を決定し、未知のタンパク質をコードすることが明らかになったcDNAについては、それをプローブとして全長クローンを単離し、全長の塩基配列を決定することができる。これらの操作は、当業者にとってすべて公知の方法で行なわれる。

## 【0036】

配列番号2、3、6または7で示される塩基配列が、一部、好ましくは全てが確定されると哺乳類に存在する本発明のタンパクをコードするDNAもしくは本発明タンパクのホモログおよびサブセットをコードするDNAを得ることがで

きる。適当な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを合成し、それを用いて、哺乳類由来のcDNAライブラリーあるいはmRNAからPCR法により、あるいは適当な塩基配列の断片をプローブとしてハイブリダイズさせることにより、他の哺乳類cDNAライブラリーあるいは該ゲノムライブラリーから、他の哺乳類型の当該タンパクをコードするDNAを得ることができる。

#### 【0037】

このようにして得られたcDNAが、SSTで得られたcDNA断片の塩基配列（またはその相同配列）を含んでいるならばシグナルシーケンスをコードしていることになるので、該cDNAが全長、またはほぼ全長であることは明らかである（シグナルシーケンスは例外なくタンパク質のN末端に存在することから、cDNAのオープンリーディングフレームの5'末端にコードされている）。

#### 【0038】

さらに、公知の方法に従い該cDNAをプローブとしてノザン（Northern）解析によって全長の確認ができる。ハイブリダイズしたバンドから得られるmRNAのサイズと該cDNAのサイズを比較し、ほぼ同じであれば該cDNAはほぼ全長であると考えられる。

#### 【0039】

配列番号2、3、6または7で示される塩基配列が一旦確定されると、その後は、化学合成によって、あるいは該塩基配列の断片を化学合成し、これをプローブとしてハイブリダイズさせることにより、本発明のDNAを得ることができる。さらに、本DNAを含有するベクターDNAを適当な宿主に導入し、これを増殖させることによって、目的とするDNAを必要量得ることができる。

#### 【0040】

本発明のポリペプチドを取得する方法としては、

- (1) 生体または培養細胞から精製単離する方法、
- (2) ペプチド合成する方法、または
- (3) 遺伝子組み換え技術を用いて生産する方法、

などが挙げられるが、工業的には(3)に記載した方法が好ましい。

## 【0041】

遺伝子組み換え技術を用いてポリペプチドを生産するための発現系（宿主ベクター系）としては、例えば、細菌、酵母、昆虫細胞および哺乳動物細胞の発現系が挙げられる。

## 【0042】

例えば、大腸菌で発現させる場合には、成熟タンパク部分をコードするDNAの5'末端に開始コドン（ATG）を付加し、得られたDNAを、適当なプロモーター（例えば、trpプロモーター、lacプロモーター、λPLプロモーター、T7プロモーター等）の下流に接続し、大腸菌内で機能するベクター（例えば、pBR322、pUC18、pUC19等）に挿入して発現ベクターを作製する。

## 【0043】

次に、この発現ベクターで形質転換した大腸菌（例えば、E.Coli DH1、E.Coli JM109、E.Coli HB101株等）を適当な培地で培養して、その菌体より目的とするポリペプチドを得ることができる。また、バクテリアのシグナルペプチド（例えば、pelBのシグナルペプチド）を利用すれば、ペリプラズム中に目的とするポリペプチドを分泌することもできる。さらに、他のポリペプチドとのフュージョン・プロテイン（fusion protein）を生産することもできる。

## 【0044】

また、哺乳動物細胞で発現させる場合には、例えば、配列番号3または7で示される塩基配列をコードするDNAを適当なベクター（例えば、レトロウイルスベクター、パピローマウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、SV40系ベクター等）中の適当なプロモーター（例えば、SV40プロモーター、LTRプロモーター、メタロチオネインプロモーター等）の下流に挿入して発現ベクターを作製する。次に、得られた発現ベクターで適当な哺乳動物細胞（例えば、サルCOS-7細胞、チャイニーズハムスターCHO細胞、マウスL細胞等）を形質転換し、形質転換体を適当な培地で培養することによって、その細胞膜上に目的とするポリペプチドが発現される。さらに配列番号3または7で示される塩基配列をコードするDNAの膜貫通領域を欠いた欠失体を上記ベクターに挿入

し、これを用いて適当な哺乳類動物細胞を形質転換することによって、その培養液中に目的とする可溶性ポリペプチドが分泌される。以上のようにして得られたポリペプチドは、一般的な生化学的方法によって単離精製することができる。

#### 【0045】

##### 【発明の効果】

本発明のポリペプチドOAF065はTNF受容体ファミリーに属する一群の蛋白と有意な相同性を示した。TNF受容体ファミリーに属する蛋白は細胞外ドメインに6つのCys残基を含む繰り返し構造を3～6つもつI型の膜蛋白で、そのリガンドとの相互作用により、様々な細胞の増殖、分化、細胞死といった現象に関わっていることが明らかとなっている (Craig A. Smith et.al., Cell, 76, 959-962, 1994)。

#### 【0046】

例えば、神経成長因子 (NGF) 受容体/NGFは各種の神経系の細胞の生存維持、神経突起の伸長、神経伝達物質の合成促進に必須である (Chao M.V., J.Neurobiol., 25,1373-1385,1994)。

Fas/FasLはそのアポトーシス誘導活性を介して癌細胞の破壊や自己反応性リンパ球の除去といった生体の恒常性維持に必須であるとともにAIDSにおけるCD4陽性T細胞の減少、劇症肝炎、移植後の移植片対宿主 (GVHD)、各種の自己免疫疾患の発症に関与している (Nagata.S.et.al. Science, 267,1449-1456,1995)。

CD40/CD40LはT/B細胞間相互作用を介してB細胞の活性化 (増殖および抗体産生促進) に必須である (Banchereau J.et.al. Annu.Rev. Immunol., 12,881-922,1994)。

#### 【0047】

TNF受容体/TNFおよびリンボトキシン (LT)受容体/LTは各種免疫・造血細胞の増殖、活性化、分化誘導、腫瘍細胞の細胞障害、増殖抑制、各種結合組織 (血管内皮細胞、線維芽細胞、骨芽細胞等) の増殖、活性化、ウイルス増殖抑制等の作用を有するとともに、リンパ組織の形態あるいは器官形成にも必須である (Ware C. F. et al. Curr.Topics Microbiol. Immunol., 198,175-218,1

995)。

## 【0048】

本ポリペプチドも細胞外ドメインにCysの繰り返し構造が3ヵ所存在することから新規のTNF受容体ファミリーに属する蛋白であり、既知または未知のTNFファミリーに属するリガンドを介して作用することは明白である。したがって、本発明のポリペプチドは造血・免疫・神経系細胞の分化、増殖、成長、生存維持または細胞死に関連した生物活性、免疫系の機能に関連した生物活性、腫瘍の増殖、成長あるいは炎症に関連した生物活性、また骨代謝に関連した生物活性を有していると考えられる。

## 【0049】

例えば、B細胞、T細胞、肥満細胞の増殖または細胞死、免疫グロブリンのクラススイッチ促進によるクラス特異的誘導、B細胞の抗体産生細胞への分化、顆粒球前駆細胞の増殖または分化、細胞死、単球・マクロファージ前駆細胞の増殖または分化、細胞死、好中球、単球・マクロファージ、好酸球、好塩基球の増殖または機能亢進、細胞死、巨核球前駆細胞の増殖または細胞死、好中球前駆細胞の増殖または分化、細胞死、BまたはT前駆細胞の増殖または分化、細胞死、赤血球の産生促進、赤血球、好中球、好酸球、好塩基球、単球・マクロファージ、肥満細胞、巨核球前駆細胞の増殖支持、好中球、単球・マクロファージ、B細胞またはT細胞の遊走促進、胸腺細胞の増殖または細胞死、脂肪細胞の分化抑制、ナチュラルキラー細胞の増殖または細胞死、造血幹細胞の増殖または細胞死、幹細胞および各種造血前駆細胞の増殖抑制、間葉系幹細胞からの骨芽細胞、軟骨細胞への分化促進または増殖、細胞死、あるいは破骨細胞の活性化や単球から破骨細胞への分化促進による骨吸収の促進の作用を本ポリペプチドのみで、またリガンドーレセプター間の結合を介して、あるいは他の分子と相乗的に働くことにより有する可能性がある。

## 【0050】

また、本ペプチドは神経系にも作用することが予測されるので、各種神経伝達物質作動性神経細胞への分化ならびにそれらの生存維持または細胞死、グリア細胞の増殖促進または細胞死、神経突起の伸展、神経節細胞の生存維持または細胞

死、アストロサイトの増殖または分化促進または細胞死、末梢神経の増殖または生存維持、細胞死、シュワン細胞の増殖または細胞死、運動神経の増殖または生存維持、細胞死の作用もある可能性がある。

#### 【0051】

さらに、本ポリペプチドは初期胚の発生過程において、外胚葉誘導作用による表皮、脳、背骨、神経の器官形成、中胚葉誘導作用による背索結合組織（骨、筋肉、腱）、血球細胞、心臓、腎臓、生殖巣の器官形成、あるいは内胚葉誘導作用による消化器系臓器（胃、腸、肝臓、脾臓）、呼吸器系（肺、気管）の形成に促進的または抑制的に作用する可能性があるとともに、生体においても上記器官の増殖あるいは増殖抑制作用を有する可能性がある。

#### 【0052】

TNF受容体ファミリーの多くが生体内で可溶化型受容体を発現していることが知られている。可溶化型受容体はそのリガンドと結合することにより、リガンドをトラップして作用を阻害することが知られている。したがって本ポリペプチドの細胞外ドメインのペプチドはそれ自身で阻害剤として機能することは公知の事実である。

#### 【0053】

したがって、本発明のポリペプチドはそれ自身で、免疫系または神経系もしくは骨代謝の機能の低下または亢進に関する疾患、または造血系細胞の発育不全または異常増殖、例えば、炎症性疾患（リウマチ、潰瘍性大腸炎等）、骨髄移植後の造血幹細胞の減少症、ガン、白血病に対する放射線照射または化学療法剤投与後の白血球、血小板、B細胞またはT細胞の減少症、貧血、感染症、ガン、白血病、AIDS、骨代謝異常（骨粗鬆症等）、各種変性疾患（アルツハイマー病、多発性硬化症等）、あるいは神経損傷の予防または治療薬として用いることが期待される。

#### 【0054】

また本発明のポリペプチドは、外胚葉、中胚葉または内胚葉由来器官の分化または増殖作用を有する可能性があるため、各器官（表皮、骨、筋肉、腱、心臓、腎臓、胃、腸、肝臓、脾臓、肺、気管等）の組織修復剤として用いることも期待

される。

【0055】

また、本発明のポリペプチドのポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を用いて、生体における該ポリペプチドの定量が行なえ、これによって本発明ポリペプチドと疾患との関係の研究あるいは疾患の診断等に利用することができる。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体は該ポリペプチドあるいはその断片を抗原として用いて常法により作製することができる。

また本発明ポリペプチド（好ましくはその細胞外ドメインのポリペプチド）を用いることにより、例えばアフィニティーカラムを作製して、本ポリペプチドと結合する既知または未知の蛋白（リガンド）の同定、精製あるいはその遺伝子クローニングを行なうことができる。

【0056】

また本発明ポリペプチド（好ましくはその膜貫通領域または細胞内ドメインのポリペプチド）を用いて、例えばウエストーウエスタン法により、または該DNA（好ましくは該ポリペプチドの膜貫通領域または細胞内ドメインをコードするDNA）を用いて、例えば酵母2-ハイブリッド法により該ポリペプチドと細胞質内で相互作用する下流のシグナル伝達分子の同定、遺伝子クローニングを行なうこともできる。

【0057】

さらに本発明のポリペプチドを用いることによって、本ポリペプチドレセプターアゴニスト、アンタゴニストおよび受容体-シグナル伝達分子間の阻害剤等のスクリーニングを行なうこともできる。

【0058】

本発明のDNAは、多大な有用性が期待される本発明のポリペプチドを生産する際の重要かつ必須の鋳型となるだけでなく、遺伝病の診断や治療（遺伝子欠損症の治療またはアンチセンスDNA（RNA）によって、ポリペプチドの発現を停止させることによる治療等）に利用できる。また、本発明のDNAをプローブとしてジェノミック（genomic）DNAを分離できる。同様にして、本発明DNAと相同性の高いヒトの関連ポリペプチドの遺伝子、またマウス以外の生物にお



ける本発明ポリペプチドと相同性の高いポリペプチドの遺伝子を分離することも可能である。

#### 【0059】

##### 【医薬品への適用】

造血系細胞の発育不全や異常増殖、神経系機能の亢進や低下、免疫系機能の亢進や低下に関する疾患、例えば炎症性疾患（リウマチ、潰瘍性大腸炎等）、骨髄移植後の造血幹細胞の減少症、放射線治療後または化学療法剤投与後の白血球、血小板、B細胞またはT細胞の減少症、貧血、感染症、ガン、白血病、AIDS、各種変性疾患（アルツハイマー病、多発性硬化症等）、または神経損傷の予防または治療、骨代謝異常（骨粗鬆症等）の予防または治療薬、あるいは組織修復等のために、本発明のポリペプチド、あるいは本発明のポリペプチドに対する抗体は通常、全身的又は局所的に、一般的には経口または非経口の形で投与される。好ましくは、経口投与、静脈内投与および脳室内投与である。

#### 【0060】

投与量は、年齢、体重、症状、治療効果、投与方法、処理時間等により異なるが、通常、成人一人あたり、一回につき、 $100\mu\text{g}$ から $100\text{mg}$ の範囲で、一日一回から数回経口投与されるかまたは、成人一人当り、一回につき、 $10\mu\text{g}$ から $100\text{mg}$ の範囲で、一日一回から数回非経口投与される。

もちろん前記したように、投与量は、種々の条件により変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、また範囲を越えて必要な場合もある。

#### 【0061】

本発明化合物を投与する際には、経口投与のための固体組成物、液体組成物およびその他の組成物、非経口投与のための注射剤、外用剤、坐剤等として用いられる。

経口投与のための固体組成物には、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤等が含まれる。カプセルには、ソフトカプセルおよびハードカプセルが含まれる。

#### 【0062】

このような固体組成物においては、一つまたはそれ以上の活性物質が、少なくとも一つの不活性な希釈剤（例えば、ラクトース、マンニトール、グルコース、

ヒドロキシプロピルセルロース、微結晶セルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム等）と混合される。組成物は、常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加物、例えば、潤滑剤（ステアリン酸マグネシウム等）、崩壊剤（繊維素グリコール酸カルシウム等）、安定化剤（ヒト血清アルブミン、ラクトース等）、溶解補助剤（アルギニン、アスパラギン酸等）を含有していてもよい。

## 【0063】

錠剤または丸剤は、必要により白糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート等の胃溶性あるいは腸溶性のフィルムで皮膜してもよいし、また2以上の層で皮膜してもよい。さらにゼラチンのような吸収されうる物質のカプセルも包含される。

## 【0064】

経口投与のための液体組成物は、薬学的に許容される乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤等を含み、一般に用いられる不活性な希釈剤（例えば、精製水、エタノール等）を含んでいてもよい。この様な組成物は、不活性な希釈剤以外に湿潤剤、懸濁剤のような補助剤、甘味剤、風味剤、芳香剤、防腐剤を含有していてもよい。

## 【0065】

経口投与のためのその他の組成物としては、ひとつまたはそれ以上の活性物質を含み、それ自体公知の方法により処方されるスプレー剤が含まれる。この組成物は不活性な希釈剤以外に亜硫酸水素ナトリウムのような安定剤と等張性を与えるような安定化剤、塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウムあるいはクエン酸のような等張剤を含有していてもよい。スプレー剤の製造方法は、例えば米国特許第2,868,691号および同第3,095,355号明細書に詳しく記載されている。

## 【0066】

本発明による非経口投与のための注射剤としては、無菌の水性または非水性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤を包含する。水性または非水性の溶液剤、懸濁剤としては、一つまたはそれ以上の活性物質が、少なくとも一つの不活性な希釈剤と混合される。水性の希釈剤としては、例えば注射用蒸留水および生理食塩水が挙げら

れる。非水性の希釈剤としては、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類、ポリソルベート80（登録商標）等が挙げられる。

#### 【0067】

このような組成物は、さらに防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ラクトース等）、溶解補助剤（例えば、アルギニン、アスパラギン酸等）のような補助剤を含んでいてもよい。

#### 【0068】

#### 【実施例】

以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を制限するものではない。

#### 実施例

ヒト骨髓ストローマ細胞株HAS303（東京医科大学第一内科外山圭助教授、相沢信助手より供与。J. Cell. Physiol., 148 : 245-251(1991)およびExperimental Hematol., 22 : 482-487(1994)に記載されている。）よりTRIzol試薬（TRIzol reagent（登録商標、GIBCOBRLより販売））を用いて全RNAを抽出し、mRNA・ピュリフィケーション・キット（mRNA Purification Kit（商品名、Pharmaciaより販売））を用いてpoly(A)-RNAを精製した。XhoI部位を連結したランダム9mer（5'-CGATTGAATTCTAGACCTGCCTCGAGNNNNNNNNNN-3'）をプライマーとして、スーパースクリプト・プラスミド・システム（SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning（商品名、GIBCOBRLより販売））を用いて2本鎖cDNAの合成を行なった。

#### 【0069】

EcoRIアダプター（GIBCOBRLより販売）をDNA・ライゲーション・キット・ver.2（DNA ligation kit ver.2（商品名、宝酒造（株）より販売）以後DNAの連結はすべて本キットを使用した。）を用いて連結した後、XhoIで消化し、アガロース電気泳動で300～800bpのcDNAを切り出して分画し、pSUC2（米国特許5536637号参照）のEcoRI/NotI部位に連結し

、大腸菌DH10B株にエレクトロポレーション法で形質転換して酵母SST用のcDNAライブラリーを得た。

【0070】

このcDNAライブラリーのプラスミドを調製し、酢酸リチウム法 (Current Protocols In Molecular Biology 13.7.1を参照) により酵母YTK12株を形質転換し、トリプトファン (Trp) を含まない酵母形質転換体の選択培地 (CMD-Trp培地) のプレート上にまき、30℃で48時間インキュベートした後、アクトラン・レプリカ・プレーター (Accutran Replica Plater (商品名、Schleicher&Schuellより販売)) を用いて得られたコロニー (形質転換体) のレプリカをラフィノースを炭素源とするYPRプレートにとり、30℃で14日間インキュベートした。3日目以降、出現してきた各々のコロニーを一つずつ再度YPRプレートにストリークして30℃で48時間インキュベートした後、シングルコロニーをYPD培地に植菌し、30℃で48時間インキュベートした後、プラスミドを調製した。

【0071】

続いてpSUC2のクローニングサイトの両端の配列の2種類のプライマー (センス鎖はビオチン化プライマー) を用いて公知の方法に従ってPCRを行ない、インサートcDNAを増幅した後、ダイナビーズ (Dynabeads, 商品名、DYNALより販売) を用いてビオチン化1本鎖DNAを精製し、塩基配列の決定を行なった。塩基配列の決定はDNA・シーケンシング・キット (DNA Sequencing kit (Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction) (商品名、Applied Biosystems Inc. より販売)) を用いた蛍光ダイターミネーターサイクルシーケンシング法で反応を行ない、自動DNAシーケンサー373 (Applied Biosystems Inc.) で読み取りを行なった (以下、塩基配列決定はすべて本方法で行なった)。

【0072】

その中の1クローンOAF065について得られた塩基配列および推定されるアミノ酸配列についてデータベースとの相同性検索を行なった結果、データベースに登録されていない新規のDNAであることが明らかとなった。また推定され

るアミノ酸配列を既知のシグナルシーケンスと比較することにより本DNAが機能的かつ構造的にもシグナルシーケンスを有することが確認された。

次に3' RACE (Rapid Amplification of cDNA End) 法によりOAF065の全長cDNAを単離した。3' RACE法はマラソン・cDNA・アンプリフィケーション・キット (Marathon cDNA Amplification Kit (商品名、Clontech社より販売)) を用いた。このキットの方法に従ってHAS303のpoly (A) RNAよりアダプターを連結した2本鎖cDNAを調製した。SSTで得られた塩基配列の情報に基づいて推定翻訳開始点ATG領域を含む28merのOAF065特異的プライマーF3 (5' -AGAAAGATGGCTTTAAAGTGCTACTAG-3') を作製して、該キットに添付されたアダプタープライマーとでPCRを行なった。その結果、4.0kbと1.5kbの2種類のDNAが増幅されたため、4.0kbのcDNAをOAF065 $\alpha$ 、1.5kbのcDNAをOAF065 $\beta$ と命名した。

#### 【0073】

この2種類のDNAをアガロース電気泳動で分画後、pT7ブルー2・Tベクター (pT7Blue-2 T-Vector (商品名、Novagenより販売)) に連結し、大腸菌DH5 $\alpha$ に形質転換してプラスミドを調製した。初めに5' 側の塩基配列を決定し、両者にOAF065特異的プライマーF3の塩基配列が存在することを確認した後、OAF065 $\alpha$ に関しては5' 側の約1.7bを、OAF065 $\beta$ に関しては全塩基配列を決定し、それぞれ配列番号3および7に示す配列を得た。さらにオープンリーディングフレームを検索し、アミノ酸に翻訳して配列番号1および5に示す配列を得た。

#### 【0074】

OAF065 $\alpha$ およびOAF065 $\beta$ の塩基配列を比較すると、5' 側の1～1290bまでの塩基配列はすべて一致していたが、1291b以降の塩基配列は全く相同性が認められなかった。またOAF065 $\alpha$ およびOAF065 $\beta$ のアミノ酸配列を比較するとN末端側の1～415アミノ酸はすべて一致しており、OAF065 $\alpha$ のC末端側2アミノ酸 (GluAla) のみがOAF065 $\beta$ では8アミノ酸 (ValArgGlnArgLeuGlySerLeu) に置換されてい

た。また疎水性プロットによる解析からOAF065 $\alpha$ およびOAF065 $\beta$ はI型の膜蛋白質であり、細胞外領域と膜貫通領域はすべて共通であることが判明した。

【0075】

さらにスイスプロット (Swiss Prot Release 33) に登録されている既知のポリペプチドのアミノ酸配列と比較した結果、本発明のポリペプチドOAF065 $\alpha$ とOAF065 $\beta$ は未知であったが、細胞外領域にTNF受容体ファミリーに共通するCysリッチ領域を有することが判明した。すなわち、図1に他のTNF受容体ファミリーであるヒト腫瘍壊死因子受容体1 (hTNFR1)、ヒト腫瘍壊死因子受容体2 (hTNFR2)、ヒト神経成長因子受容体 (hNGFR) およびヒトFas (hFas) とのアミノ酸配列の比較を示す通り (アミノ酸を1文字記号で示す。)、本発明ポリペプチド (OAF065) はI型の膜蛋白質で細胞外領域に腫瘍壊死因子 (Tumor necrosis factor: TNF) 受容体ファミリーに共通するCysリッチ領域を有することが判明した。このことから、本発明のポリペプチドOAF065 $\alpha$ およびOAF065 $\beta$ は、TNF受容体ファミリーに属する新規の膜蛋白質であることが確認された。

【0076】

## 【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：417

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

## 配列

Met Ala Leu Lys Val Leu Leu Glu Gln Glu Lys Thr Phe Phe Thr Leu

1

5

10

15

Leu Val Leu Leu Gly Tyr Leu Ser Cys Lys Val Thr Cys Glu Thr Gly

20

25

30

Asp Cys Arg Gln Gln Glu Phe Arg Asp Arg Ser Gly Asn Cys Val Pro

35

40

45

Cys Asn Gln Cys Gly Pro Gly Met Glu Leu Ser Lys Glu Cys Gly Phe

50

55

60

Gly Tyr Gly Glu Asp Ala Gln Cys Val Thr Cys Arg Leu His Arg Phe

65

70

75

80

Lys Glu Asp Trp Gly Phe Gln Lys Cys Lys Pro Cys Leu Asp Cys Ala

85

90

95

Val Val Asn Arg Phe Gln Lys Ala Asn Cys Ser Ala Thr Ser Asp Ala

100

105

110

Ile Cys Gly Asp Cys Leu Pro Gly Phe Tyr Arg Lys Thr Lys Leu Val

115

120

125

Gly Phe Gln Asp Met Glu Cys Val Pro Cys Gly Asp Pro Pro Pro Pro

130

135

140

Tyr Glu Pro His Cys Ala Ser Lys Val Asn Leu Val Lys Ile Ala Ser

145

150

155

160

Thr Ala Ser Ser Pro Arg Asp Thr Ala Leu Ala Ala Val Ile Cys Ser

165	170	175
Ala Leu Ala Thr Val Leu Leu Ala Leu Leu Ile Leu Cys Val Ile Tyr		
180	185	190
Cys Lys Arg Gln Phe Met Glu Lys Lys Pro Ser Trp Ser Leu Arg Ser		
195	200	205
Gln Asp Ile Gln Tyr Asn Gly Ser Glu Leu Ser Cys Leu Asp Pro Arg		
210	215	220
Gln Leu His Glu Tyr Ala His Arg Ala Cys Cys Gln Cys Arg Arg Asp		
225	230	235
Ser Val Gln Thr Cys Gly Pro Val Arg Leu Leu Pro Ser Met Cys Cys		
245	250	255
Glu Glu Ala Cys Ser Pro Asn Pro Ala Thr Leu Gly Cys Gly Val His		
260	265	270
Ser Ala Ala Ser Leu Gln Ala Arg Asn Ala Gly Pro Ala Gly Glu Met		
275	280	285
Val Pro Thr Phe Phe Gly Ser Leu Thr Gln Ser Ile Cys Gly Glu Phe		
290	295	300
Ser Asp Ala Trp Pro Leu Met Gln Asn Pro Met Gly Gly Asp Asn Ile		
305	310	315
Ser Phe Cys Asp Ser Tyr Pro Glu Leu Thr Gly Glu Asp Ile His Ser		
325	330	335
Leu Asn Pro Glu Leu Glu Ser Ser Thr Ser Leu Asp Ser Asn Ser Ser		
340	345	350
Gln Asp Leu Val Gly Gly Ala Val Pro Val Gln Ser His Ser Glu Asn		
355	360	365
Phe Thr Ala Ala Thr Asp Leu Ser Arg Tyr Asn Asn Thr Leu Val Glu		
370	375	380
Ser Ala Ser Thr Gln Asp Ala Leu Thr Met Arg Ser Gln Leu Asp Gln		
385	390	395
		400



Glu Ser Gly Ala Ile Ile His Pro Ala Thr Gln Thr Ser Leu Gln Glu

405

410

415

Ala

【0077】

配列番号：2

配列の長さ：1269

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列

ATGGCTTTAA AAGTGCTACT AGAACAAGAG AAAACGTTTT TCACTCTTTT AGTATTACTA 60  
 GGCTATTTGT CATGTAAAGT GACTTGTGAA ACAGGAGACT GTAGACAGCA AGAATTCAGG 120  
 GATCGGTCTG GAAACTGTGT TCCCTGCAAC CAGTGTGGGC CAGGCATGGA GTTGTCTAAG 180  
 GAATGTGGCT TCGGCTATGG GGAGGATGCA CAGTGTGTGA CGTGCCGGCT GCACAGGTTC 240  
 AAGGAGGACT GGGGCTTCCA GAAATGCAAG CCCTGTCTGG ACTGCGCAGT GGTGAACCGC 300  
 TTTCAGAAGG CAAATTGTTC AGCCACCAGT GATGCCATCT GCGGGGACTG CTTGCCAGGA 360  
 TTTTATAGGA AGACGAAACT TGTGGGCTTT CAAGACATGG AGTGTGTGCC TTGTGGAGAC 420  
 CCTCCTCCTC CTTACGAACC GCACTGTGCC AGCAAGGTCA ACCTCGTGAA GATCGCGTCC 480  
 ACGGCCTCCA GCCCAGGGA CACGGCGCTG GCTGCCGTTA TCTGCAGCGC TCTGGCCACC 540  
 GTCCTGCTGG CCCTGCTCAT CCTCTGTGTC ATCTATTGTA AGAGACAGTT TATGGAGAAG 600  
 AAACCCAGCT GGTCTCTGCG GTCACAGGAC ATTCAGTACA ACGGCTCTGA GCTGTCTGTG 660  
 CTTGACAGAC CTCAGCTCCA CGAATATGCC CACAGAGCCT GCTGCCAGTG CCGCCGTGAC 720  
 TCAGTGCAGA CCTGCGGGCC GGTGCGCTTG CTCCCATCCA TGTGCTGTGA GGAGGCCTGC 780  
 AGCCCCAACC CGGCGACTCT TGGTTGTGGG GTGCATTCTG CAGCCAGTCT TCAGGCAAGA 840  
 AACGCAGGCC CAGCCGGGGA GATGGTGCCG ACTTTCTTCG GATCCCTCAC GCAGTCCATC 900  
 TGTGGCGAGT TTTCAGATGC CTGGCCTCTG ATGCAGAATC CCATGGGTGG TGACAACATC 960  
 TCTTTTGTG ACTCTTATCC TGAAC TCACT GGAGAAGACA TTCATTCTCT CAATCCAGAA 1020

CTTGAAAGCT CAACGTCTTT GGATTCAAAT AGCAGTCAAG ATTTGGTTGG TGGGGCTGTT 1080  
 CCAGTCCAGT CTCATTCTGA AAACTTTACA GCAGCTACTG ATTTATCTAG ATATAACAAC 1140  
 AACTGGTAG AATCAGCATC AACTCAGGAT GCACTAACTA TGAGAAGCCA GCTAGATCAG 1200  
 GAGAGTGGCG CTATCATCCA CCCAGCCACT CAGACGTCCC TCCAGGTAAG GCAGCGACTG 1260  
 GGTTCCCTG 1269

【0078】

配列番号：3

配列の長さ：1704

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列

GGGAACGTAG AACTCTCCAA CAATAAATAC ATTTGATAAG AAAGATGGCT TAAAAAGTGC 60  
 TACTAGAACA AGAGAAAACG TTTTTCACCTC TTTTAGTATT ACTAGGCTAT TTGTCATGTA 120  
 AAGTGACTTG TGAAACAGGA GACTGTAGAC AGCAAGAATT CAGGGATCGG TCTGGAAACT 180  
 GTGTTCCCTG CAACCAGTGT GGGCCAGGCA TGGAGTTGTC TAAGGAATGT GGCTTCGGCT 240  
 ATGGGGAGGA TGCACAGTGT GTGACGTGCC GGCTGCACAG GTTCAAGGAG GACTGGGGCT 300  
 TCCAGAAATG CAAGCCCTGT CTGGACTGCG CAGTGGTGAA CCGCTTTCAG AAGGCAAATT 360  
 GTTCAGCCAC CAGTGATGCC ATCTGCGGGG ACTGCTTGCC AGGATTTTAT AGGAAGACGA 420  
 AACTTGTCGG CTTTCAAGAC ATGGAGTGTG TGCCTTGTGG AGACCCCTCCT CCTCCTTACG 480  
 AACC GCACTG TGCCAGCAAG GTCAACCTCG TGAAGATCGC GTCCACGGCC TCCAGCCCAC 540  
 GGGACACGGC GCTGGCTGCC GTTATCTGCA GCGCTCTGGC CACCGTCCTG CTGGCCCTGC 600  
 TCATCCTCTG TGTCATCTAT TGTAAGAGAC AGTTTATGGA GAAGAAACCC AGCTGGTCTC 660  
 TGCGGTCACA GGACATTCAG TACAACGGCT CTGAGCTGTC GTGTCTTGAC AGACCTCAGC 720  
 TCCACGAATA TGCCACAGGA GCCTGCTGCC AGTGCCGCCG TGAATCAGTG CAGACCTGCG 780  
 GGCCGGTGCG CTTGCTCCCA TCCATGTGCT GTGAGGAGGC CTGCAGCCCC AACCCGGCGA 840  
 CTCTTGTTG TGGGGTGCAT TCTGCAGCCA GTCTTCAGGC AAGAAACGCA GGCCAGCCG 900  
 GGGAGATGGT GCCGACTTTC TTCGGATCCC TCACGCAGTC CATCTGTGGC GAGTTTTCAG 960

ATGCCTGGCC TCTGATGCAG AATCCCATGG GTGGTGACAA CATCTCTTTT TGTGACTCTT 1020  
 ATCCTGAACT CACTGGAGAA GACATTCATT CTCTCAATCC AGAACTTGAA AGCTCAACGT 1080  
 CTTTGGATTC AAATAGCAGT CAAGATTTGG TTGGTGGGGC TGTTCAGTC CAGTCTCATT 1140  
 CTGAAAACTT TACAGCAGCT ACTGATTTAT CTAGATATAA CAACACACTG GTAGAATCAG 1200  
 CATCAACTCA GGATGCACTA ACTATGAGAA GCCAGCTAGA TCAGGAGAGT GCGGCTATCA 1260  
 TCCACCCAGC CACTCAGACG TCCCTCCAGG AAGCTTAAAG AACCTGCTTC TTTCTGCAGT 1320  
 AGAAGCGTGT GCTGGAACCC AAAGAGTACT CCTTTGTTAG GCTTATGGAC TGAGCAGTCT 1380  
 GGACCTTGCA TGGCTTCTGG GGCAAAAATA AATCTGAACC AAAGTACCGG CATTGGAAGC 1440  
 CTTTCAGCCA GTTGCTTCTG AGCCAGACCA GCTGTAAGCT GAAACCTCAA TGAATAACAA 1500  
 GAAAAGACTC CAGGCCGACT CATGATACTC TGCATCTTTC CTACATGAGA AGCTTCTCTG 1560  
 CCACAAAAGT GACTTCAAAG ACGGATGGGT TGAGCTGGCA GCCTATGAGA TTGTGGACAT 1620  
 ATAACAAGAA ACAGAAATGC CCTCATGCTT ATTTTCATGG TGATTGTGGT TTTACAAGAC 1680  
 TGAAGACCCA GAGTATACTT TTTC 1704

【0079】

配列番号：4

配列の長さ：1704

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

生物名：Homo Sapiens

セルライン：HAS303

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：45..1295

特徴を決定した方法：P

特徴を表す記号：sig peptide

存在位置：45..119

特徴を決定した方法：S

特徴を表す記号：mat peptide

存在位置：120..1295

特徴を決定した方法：S

配列

GGGAACGTAG AACTCTCCAA CAATAAATAC ATTTGATAAG AAAG ATG GCT TTA AAA	56
Met Ala Leu Lys	
-25	
GTG CTA CTA GAA CAA GAG AAA ACG TTT TTC ACT CTT TTA GTA TTA CTA	104
Val Leu Leu Glu Gln Glu Lys Thr Phe Phe Thr Leu Leu Val Leu Leu	
-20 -15 -10	
GGC TAT TTG TCA TGT AAA GTG ACT TGT GAA ACA GGA GAC TGT AGA CAG	152
Gly Tyr Leu Ser Cys Lys Val Thr Cys Glu Thr Gly Asp Cys Arg Gln	
-5 1 5 10	
CAA GAA TTC AGG GAT CGG TCT GGA AAC TGT GTT CCC TGC AAC CAG TGT	200
Gln Glu Phe Arg Asp Arg Ser Gly Asn Cys Val Pro Cys Asn Gln Cys	
15 20 25	
GGG CCA GGC ATG GAG TTG TCT AAG GAA TGT GGC TTC GGC TAT GGG GAG	248
Gly Pro Gly Met Glu Leu Ser Lys Glu Cys Gly-Phe Gly Tyr Gly Glu	
30 35 40	
GAT GCA CAG TGT GTG ACG TGC CGG CTG CAC AGG TTC AAG GAG GAC TGG	296
Asp Ala Gln Cys Val Thr Cys Arg Leu His Arg Phe Lys Glu Asp Trp	
45 50 55	
GGC TTC CAG AAA TGC AAG CCC TGT CTG GAC TGC GCA GTG GTG AAC CGC	344
Gly Phe Gln Lys Cys Lys Pro Cys Leu Asp Cys Ala Val Val Asn Arg	
60 65 70 75	
TTT CAG AAG GCA AAT TGT TCA GCC ACC AGT GAT GCC ATC TGC GGG GAC	392



220	225	230	235	
AGC CCC AAC CCG GCG ACT CTT GGT TGT GGG GTG CAT TCT GCA GCC AGT				872
Ser Pro Asn Pro Ala Thr Leu Gly Cys Gly Val His Ser Ala Ala Ser				
240	245	250		
CTT CAG GCA AGA AAC GCA GGC CCA GCC GGG GAG ATG GTG CCG ACT TTC				920
Leu Gln Ala Arg Asn Ala Gly Pro Ala Gly Glu Met Val Pro Thr Phe				
255	260	265		
TTC GGA TCC CTC ACG CAG TCC ATC TGT GGC GAG TTT TCA GAT GCC TGG				968
Phe Gly Ser Leu Thr Gln Ser Ile Cys Gly Glu Phe Ser Asp Ala Trp				
270	275	280		
CCT CTG ATG CAG AAT CCC ATG GGT GGT GAC AAC ATC TCT TTT TGT GAC				1016
Pro Leu Met Gln Asn Pro Met Gly Gly Asp Asn Ile Ser Phe Cys Asp				
285	290	295		
TCT TAT CCT GAA CTC ACT GGA GAA GAC ATT CAT TCT CTC AAT CCA GAA				1064
Ser Tyr Pro Glu Leu Thr Gly Glu Asp Ile His Ser Leu Asn Pro Glu				
300	305	310	315	
CTT GAA AGC TCA ACG TCT TTG GAT TCA AAT AGC AGT CAA GAT TTG GTT				1112
Leu Glu Ser Ser Thr Ser Leu Asp Ser Asn Ser Ser Gln Asp Leu Val				
320	325	330		
GGT GGG GCT GTT CCA GTC CAG TCT CAT TCT GAA AAC TTT ACA GCA GCT				1160
Gly Gly Ala Val Pro Val Gln Ser His Ser Glu Asn Phe Thr Ala Ala				
335	340	345		
ACT GAT TTA TCT AGA TAT AAC AAC ACA CTG GTA GAA TCA GCA TCA ACT				1208
Thr Asp Leu Ser Arg Tyr Asn Asn Thr Leu Val Glu Ser Ala Ser Thr				
350	355	360		
CAG GAT GCA CTA ACT ATG AGA AGC CAG CTA GAT CAG GAG AGT GGC GCT				1256
Gln Asp Ala Leu Thr Met Arg Ser Gln Leu Asp Gln Glu Ser Gly Ala				
365	370	375		
ATC ATC CAC CCA GCC ACT CAG ACG TCC CTC CAG GAA GCT TAAAGAACCT				1305

Ile Ile His Pro Ala Thr Gln Thr Ser Leu Gln Glu Ala

380

385

390

GCTTCTTTCT GCAGTAGAAG CGTGTGCTGG AACCCAAAGA GTACTCCTTT GTTAGGCTTA 1365  
TGGACTGAGC AGTCTGGACC TTGCATGGCT TCTGGGGCAA AAATAAATCT GAACCAAAC 1425  
GACGGCATTG GAAGCCTTTC AGCCAGTTGC TTCTGAGCCA GACCAGCTGT AAGCTGAAAC 1485  
CTCAATGAAT AACAAGAAAA GACTCCAGGC CGACTCATGA TACTCTGCAT CTTTCCTACA 1545  
TGAGAAGCTT CTCTGCCACA AAAGTGACTT CAAAGACGGA TGGGTTGAGC TGGCAGCCTA 1605  
TGAGATTGTG GACATATAAC AAGAAACAGA AATGCCCTCA TGCTTATTTT CATGGTGATT 1665  
GTGGTTTTAC AAGACTGAAG ACCCAGAGTA TACTTTTTTC 1704

【0080】

配列番号：5

配列の長さ：423

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列

Met Ala Leu Lys Val Leu Leu Glu Gln Glu Lys Thr Phe Phe Thr Leu

1

5

10

15

Leu Val Leu Leu Gly Tyr Leu Ser Cys Lys Val Thr Cys Glu Thr Gly

20

25

30

Asp Cys Arg Gln Gln Glu Phe Arg Asp Arg Ser Gly Asn Cys Val Pro

35

40

45

Cys Asn Gln Cys Gly Pro Gly Met Glu Leu Ser Lys Glu Cys Gly Phe

50

55

60

Gly Tyr Gly Glu Asp Ala Gln Cys Val Thr Cys Arg Leu His Arg Phe

65

70

75

80

Lys Glu Asp Trp Gly Phe Gln Lys Cys Lys Pro Cys Leu Asp Cys Ala

85

90

95

Val Val Asn Arg Phe Gln Lys Ala Asn Cys Ser Ala Thr Ser Asp Ala

100	105	110
Ile Cys Gly Asp Cys Leu Pro Gly Phe Tyr Arg Lys Thr Lys Leu Val		
115	120	125
Gly Phe Gln Asp Met Glu Cys Val Pro Cys Gly Asp Pro Pro Pro Pro		
130	135	140
Tyr Glu Pro His Cys Ala Ser Lys Val Asn Leu Val Lys Ile Ala Ser		
145	150	155
Thr Ala Ser Ser Pro Arg Asp Thr Ala Leu Ala Ala Val Ile Cys Ser		160
165	170	175
Ala Leu Ala Thr Val Leu Leu Ala Leu Leu Ile Leu Cys Val Ile Tyr		
180	185	190
Cys Lys Arg Gln Phe Met Glu Lys Lys Pro Ser Trp Ser Leu Arg Ser		
195	200	205
Gln Asp Ile Gln Tyr Asn Gly Ser Glu Leu Ser Cys Leu Asp Pro Arg		
210	215	220
Gln Leu His Glu Tyr Ala His Arg Ala Cys Cys Gln Cys Arg Arg Asp		
225	230	235
Ser Val Gln Thr Cys Gly Pro Val Arg Leu Leu Pro Ser Met Cys Cys		240
245	250	255
Glu Glu Ala Cys Ser Pro Asn Pro Ala Thr Leu Gly Cys Gly Val His		
260	265	270
Ser Ala Ala Ser Leu Gln Ala Arg Asn Ala Gly Pro Ala Gly Glu Met		
275	280	285
Val Pro Thr Phe Phe Gly Ser Leu Thr Gln Ser Ile Cys Gly Glu Phe		
290	295	300
Ser Asp Ala Trp Pro Leu Met Gln Asn Pro Met Gly Gly Asp Asn Ile		
305	310	315
Ser Phe Cys Asp Ser Tyr Pro Glu Leu Thr Gly Glu Asp Ile His Ser		320
325	330	335



Leu Asn Pro Glu Leu Glu Ser Ser Thr Ser Leu Asp Ser Asn Ser Ser

340

345

350

Gln Asp Leu Val Gly Gly Ala Val Pro Val Gln Ser His Ser Glu Asn

355

360

365

Phe Thr Ala Ala Thr Asp Leu Ser Arg Tyr Asn Asn Thr Leu Val Glu

370

375

380

Ser Ala Ser Thr Gln Asp Ala Leu Thr Met Arg Ser Gln Leu Asp Gln

385

390

395

400

Glu Ser Gly Ala Ile Ile His Pro Ala Thr Gln Thr Ser Leu Gln Val

405

410

415

Arg Gln Arg Leu Gly Ser Leu

420

【0081】

配列番号：6

配列の長さ：1269

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列

ATGGCTTTAA AAGTGCTACT AGAACAAGAG AAAACGTTTT TCACTCTTTT AGTATTACTA 60  
 GGCTATTTGT CATGTAAAGT GACTTGTGAA ACAGGAGACT GTAGACAGCA AGAATTCAGG 120  
 GATCGGTCTG GAAACTGTGT TCCCTGCAAC CAGTGTGGGC CAGGCATGGA GTTGTCTAAG 180  
 GAATGTGGCT TCGGCTATGG GGAGGATGCA CAGTGTGTGA CGTGCCGGCT GCACAGGTTC 240  
 AAGGAGGACT GGGGCTTCCA GAAATGCAAG CCCTGTCTGG ACTGCGCAGT GGTGAACCGC 300  
 TTTCAGAAGG CAAATTGTTC AGCCACCAGT GATGCCATCT GCGGGGACTG CTTGCCAGGA 360  
 TTTTATAGGA AGACGAAACT TGTCGGCTTT CAAGACATGG AGTGTGTGCC TTGTGGAGAC 420  
 CCTCCTCCTC CTTACGAACC GCACTGTGCC AGCAAGGTCA ACCTCGTGAA GATCGCGTCC 480  
 ACGGCCTCCA GCCCACGGGA CACGGCGCTG GCTGCCGTTA TCTGCAGCGC TCTGGCCACC 540

GTCCTGCTGG CCCTGCTCAT CCTCTGTGTC ATCTATTGTA AGAGACAGTT TATGGAGAAG 600  
 AAACCCAGCT GGTCTCTGCG GTCACAGGAC ATTCAGTACA ACGGCTCTGA GCTGTCGTGT 660  
 CTTGACAGAC CTCAGCTCCA CGAATATGCC CACAGAGCCT GCTGCCAGTG CCGCCGTGAC 720  
 TCAGTGCAGA CCTGCGGGCC GGTGCGCTTG CTCCCATCCA TGTGCTGTGA GGAGGCCTGC 780  
 AGCCCCAACC CGGCGACTCT TGGTTGTGGG GTGCATTCTG CAGCCAGTCT TCAGGCAAGA 840  
 AACGCAGGCC CAGCCGGGGA GATGGTGCCG ACTTTCTTCG GATCCCTCAC GCAGTCCATC 900  
 TGTGGCGAGT TTTCAGATGC CTGGCCTCTG ATGCAGAATC CCATGGGTGG TGACAACATC 960  
 TCTTTTTGTG ACTCTTATCC TGAACCTACT GGAGAAGACA TTCATTCTCT CAATCCAGAA 1020  
 CTTGAAAGCT CAACGTCTTT GGATTCAAAT AGCAGTCAAG ATTTGGTTGG TGGGGCTGTT 1080  
 CCAGTCCAGT CTCATTCTGA AAACCTTTACA GCAGCTACTG ATTTATCTAG ATATAACAAC 1140  
 ACACTGGTAG AATCAGCATC AACTCAGGAT GCACTAACTA TGAGAAGCCA GCTAGATCAG 1200  
 GAGAGTGGCG CTATCATCCA CCCAGCCACT CAGACGTCCC TCCAGGTAAG GCAGCGACTG 1260  
 GGTTCCTG 1269

【0082】

配列番号：7

配列の長さ：1496

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列

GGGAACGTAG AACTCTCCAA CAATAAATAC ATTTGATAAG AAAGATGGCT TAAAAAGTGC 60  
 TACTAGAACA AGAGAAAACG TTTTCACTC TTTTAGTATT ACTAGGCTAT TTGTCATGTA 120  
 AAGTGAAGTTG TGAACAGGA GACTGTAGAC AGCAAGAATT CAGGGATCGG TCTGGAAACT 180  
 GTGTTCCCTG CAACCAGTGT GGGCCAGGCA TGGAGTTGTC TAAGGAATGT GGCTTCGGCT 240  
 ATGGGGAGGA TGCACAGTGT GTGACGTGCC GGCTGCACAG GTTCAAGGAG GACTGGGGCT 300  
 TCCAGAAATG CAAGCCCTGT CTGGACTGCG CAGTGGTGAA CCGCTTTCAG AAGGCAAATT 360  
 GTTCAGCCAC CAGTGATGCC ATCTGCGGGG ACTGCTTGCC AGGATTTTAT AGGAAGACGA 420  
 AACTTGTCGG CTTTCAAGAC ATGGAGTGTG TGCCTTGTGG AGACCCTCCT CCTCCTTACG 480

AACCGCACTG TGCCAGCAAG GTCAACCTCG TGAAGATCGC GTCCACGGCC TCCAGCCCAC 540  
 GGGACACGGC GCTGGCTGCC GTTATCTGCA GCGCTCTGGC CACCGTCCTG CTGGCCCTGC 600  
 TCATCCTCTG TGTCATCTAT TGTAAGAGAC AGTTTATGGA GAAGAAACCC AGCTGGTCTC 660  
 TGCGGTCACA GGACATTCAG TACAACGGCT CTGAGCTGTC GTGTCTTGAC AGACCTCAGC 720  
 TCCACGAATA TGCCACACAGA GCCTGCTGCC AGTGCCGCCG TGAATCAGTG CAGACCTGCG 780  
 GGCCGGTGCG CTTGCTCCCA TCCATGTGCT GTGAGGAGGC CTGCAGCCCC AACC CGGCGA 840  
 CTCTTGTTG TGGGGTGCAT TCTGCAGCCA GTCTTCAGGC AAGAAACGCA GGCCAGCCG 900  
 GGGAGATGGT GCCGACTTTC TTCGGATCCC TCACGCAGTC CATCTGTGGC GAGTTTTT CAG 960  
 ATGCCTGGCC TCTGATGCAG AATCCCATGG GTGGTGACAA CATCTCTTTT TGTGACTCTT 1020  
 ATCCTGAACT CACTGGAGAA GACATTCATT CTCTCAATCC AGAACTTGAA AGCTCAACGT 1080  
 CTTTGATTTC AAATAGCAGT CAAGATTTGG TTGGTGGGGC TGTTCAGTC CAGTCTCATT 1140  
 CTGAAAACCTT TACAGCAGCT ACTGATTTAT CTAGATATAA CAACACACTG GTAGAATCAG 1200  
 CATCAACTCA GGATGCACTA ACTATGAGAA GCCAGCTAGA TCAGGAGAGT GGCGCTATCA 1260  
 TCCACCCAGC CACTCAGACG TCCCTCCAGG TAAGGCAGCG ACTGGGTTCC CTGTGAACAC 1320  
 AGCACTGACT TACAGTAGAT CAGAACTCTG TTCCCAGCAT AAGATTTGGG GGAACCTGAT 1380  
 GAGTTTTTTT TTTGCATCTT TAATAATTTC TTGTATGTTG TAGAGTATGT TTTAAATAA 1440  
 ATTTCAAGTA TTTTTTTTAA AACTAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA 1496

【0083】

配列番号：8

配列の長さ：1496

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

生物名：Homo Sapiens

セルライン：HAS303

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置 : 45..1313

特徴を決定した方法 : P

特徴を表す記号 : sig peptide

存在位置 : 45..119

特徴を決定した方法 : S

特徴を表す記号 : mat peptide

存在位置 : 120..1313

特徴を決定した方法 : S

配列

GGGAACGTAG AACTCTCCAA CAATAAATAC ATTTGATAAG AAAG ATG GCT TTA AAA	56
Met Ala Leu Lys	
-25	
GTG CTA CTA GAA CAA GAG AAA ACG TTT TTC ACT CTT TTA GTA TTA CTA	104
Val Leu Leu Glu Gln Glu Lys Thr Phe Phe Thr Leu Leu Val Leu Leu	
-20 -15 -10	
GGC TAT TTG TCA TGT AAA GTG ACT TGT GAA ACA GGA GAC TGT AGA CAG	152
Gly Tyr Leu Ser Cys Lys Val Thr Cys Glu Thr Gly Asp Cys Arg Gln	
-5 1 5 10	
CAA GAA TTC AGG GAT CGG TCT GGA AAC TGT GTT CCC TGC AAC CAG TGT	200
Gln Glu Phe Arg Asp Arg Ser Gly Asn Cys Val Pro Cys Asn Gln Cys	
15 20 25	
GGG CCA GGC ATG GAG TTG TCT AAG GAA TGT GGC TTC GGC TAT GGG GAG	248
Gly Pro Gly Met Glu Leu Ser Lys Glu Cys Gly Phe Gly Tyr Gly Glu	
30 35 40	
GAT GCA CAG TGT GTG ACG TGC CGG CTG CAC AGG TTC AAG GAG GAC TGG	296
Asp Ala Gln Cys Val Thr Cys Arg Leu His Arg Phe Lys Glu Asp Trp	
45 50 55	

GGC TTC CAG AAA TGC AAG CCC TGT CTG GAC TGC GCA GTG GTG AAC CGC	344
Gly Phe Gln Lys Cys Lys Pro Cys Leu Asp Cys Ala Val Val Asn Arg	
60 65 70 75	
TTT CAG AAG GCA AAT TGT TCA GCC ACC AGT GAT GCC ATC TGC GGG GAC	392
Phe Gln Lys Ala Asn Cys Ser Ala Thr Ser Asp Ala Ile Cys Gly Asp	
80 85 90	
TGC TTG CCA GGA TTT TAT AGG AAG ACG AAA CTT GTC GGC TTT CAA GAC	440
Cys Leu Pro Gly Phe Tyr Arg Lys Thr Lys Leu Val Gly Phe Gln Asp	
95 100 105	
ATG GAG TGT GTG CCT TGT GGA GAC CCT CCT CCT CCT TAC GAA CCG CAC	488
Met Glu Cys Val Pro Cys Gly Asp Pro Pro Pro Pro Tyr Glu Pro His	
110 115 120	
TGT GCC AGC AAG GTC AAC CTC GTG AAG ATC GCG TCC ACG GCC TCC AGC	536
Cys Ala Ser Lys Val Asn Leu Val Lys Ile Ala Ser Thr Ala Ser Ser	
125 130 135	
CCA CGG GAC ACG GCG CTG GCT GCC GTT ATC TGC AGC GCT CTG GCC ACC	584
Pro Arg Asp Thr Ala Leu Ala Ala Val Ile Cys Ser Ala Leu Ala Thr	
140 145 150 155	
GTC CTG CTG GCC CTG CTC ATC CTC TGT GTC ATC TAT TGT AAG AGA CAG	632
Val Leu Leu Ala Leu Leu Ile Leu Cys Val Ile Tyr Cys Lys Arg Gln	
160 165 170	
TTT ATG GAG AAG AAA CCC AGC TGG TCT CTG CGG TCA CAG GAC ATT CAG	680
Phe Met Glu Lys Lys Pro Ser Trp Ser Leu Arg Ser Gln Asp Ile Gln	
175 180 185	
TAC AAC GGC TCT GAG CTG TCG TGT CTT GAC AGA CCT CAG CTC CAC GAA	728
Tyr Asn Gly Ser Glu Leu Ser Cys Leu Asp Rro Arg Gln Leu His Glu	
190 195 200	
TAT GCC CAC AGA GCC TGC TGC CAG TGC CGC CGT GAC TCA GTG CAG ACC	776
Tyr Ala His Arg Ala Cys Cys Gln Cys Arg Arg Asp Ser Val Gln Thr	

205	210	215	
TGC GGG CCG GTG CGC TTG CTC CCA TCC ATG TGC TGT GAG GAG GCC TGC			824
Cys Gly Pro Val Arg Leu Leu Pro Ser Met Cys Cys Glu Glu Ala Cys			
220	225	230	235
AGC CCC AAC CCG GCG ACT CTT GGT TGT GGG GTG CAT TCT GCA GCC AGT			872
Ser Pro Asn Pro Ala Thr Leu Gly Cys Gly Val His Ser Ala Ala Ser			
240	245	250	
CTT CAG GCA AGA AAC GCA GGC CCA GCC GGG GAG ATG GTG CCG ACT TTC			920
Leu Gln Ala Arg Asn Ala Gly Pro Ala Gly Glu Met Val Pro Thr Phe			
255	260	265	
TTC GGA TCC CTC ACG CAG TCC ATC TGT GGC GAG TTT TCA GAT GCC TGG			968
Phe Gly Ser Leu Thr Gln Ser Ile Cys Gly Glu Phe Ser Asp Ala Trp			
270	275	280	
CCT CTG ATG CAG AAT CCC ATG GGT GGT GAC AAC ATC TCT TTT TGT GAC			1016
Pro Leu Met Gln Asn Pro Met Gly Gly Asp Asn Ile Ser Phe Cys Asp			
285	290	295	
TCT TAT CCT GAA CTC ACT GGA GAA GAC ATT CAT TCT CTC AAT CCA GAA			1064
Ser Tyr Pro Glu Leu Thr Gly Glu Asp Ile His Ser Leu Asn Pro Glu			
300	305	310	315
CTT GAA AGC TCA ACG TCT TTG GAT TCA AAT AGC AGT CAA GAT TTG GTT			1112
Leu Glu Ser Ser Thr Ser Leu Asp Ser Asn Ser Ser Gln Asp Leu Val			
320	325	330	
GGT GGG GCT GTT CCA GTC CAG TCT CAT TCT GAA AAC TTT ACA GCA GCT			1160
Gly Gly Ala Val Pro Val Gln Ser His Ser Glu Asn Phe Thr Ala Ala			
335	340	345	
ACT GAT TTA TCT AGA TAT AAC AAC ACA CTG GTA GAA TCA GCA TCA ACT			1208
Thr Asp Leu Ser Arg Tyr Asn Asn Thr Leu Val Glu Ser Ala Ser Thr			
350	355	360	
CAG GAT GCA CTA ACT ATG AGA AGC CAG CTA GAT CAG GAG AGT GGC GCT			1256

Gln Asp Ala Leu Thr Met Arg Ser Gln Leu Asp Gln Glu Ser Gly Ala

365

370

375

ATC ATC CAC CCA GCC ACT CAG ACG TCC CTC CAG GTA AGG CAG CGA CTG 1304

Ile Ile His Pro Ala Thr Gln Thr Ser Leu Gln Val Arg Gln Arg Leu

380

385

390

395

GGT TCC CTG TGAACACAG CACTGACTTA CAGTAGATCA GAACTCTGTT CCCAGCATAA 1362

Gly Ser Leu

GATTTGGGGG AACCTGATGA GTTTTTTTTT TGCATCTTTA ATAATTTCTT GTATGTTGTA 1422

GAGTATGTTT TAAAATAAAT TTCAAGTATT TTTTTTAAAA ACTAAAAAAAA AAAAAAAAAA 1482

AAAAAAAAAAAA AAAA

1496

# 【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明ポリペプチドであるOAF065と他のTNF受容体ファミリーのアミノ酸配列を比較した図である。図中、hTNFR1はヒト腫瘍壊死因子受容体1を表わし、hTNFR2はヒト腫瘍壊死因子受容体2を表わし、hNGFRはヒト神経成長因子受容体を表わし、hFasはヒトFasを表わす。

【書類名】 図面

【図1】

OAF065	1	-----	MALKVLLQE	KTF--TLLV	LLGYLSCKVT	CETGDRQOE	38
hTNFR1	1	-MGLSTVPDL	LLPLVLELL	VGIYPSGVIG	LVPHLGDREK	RDSV-CPQ GK	48
hTNFR2	1	---MAPVAV	WAALAVGLEL	WAAA--HALP	AQVAFPTYAP	EPGSTCR LRE	44
hNGFR	1	-----	--MGAGATGR	AMDG--PRLL	LLLLLGVS LG	GAKEACPTGL	36
hFas	1	MLGIWTLPL	VLTSVARLSS	KSVN--AQVT	DINSKGLELR	KTVTTVETQN	48
*							
OAF065	39	FRDRSGNCVP	CNQ-CGPGME	LSKECGFGYG	EDAQCVTRRL	HR-FK-EDWG	85
hTNFR1	49	YIHPQNN SIC	CTK-CHKGT Y	LYNDGP-GPG	QDTCRECES	GS-FTASENH	95
hTNFR2	45	YYDQTAQ-MC	CSK-CSPGQH	AKVFC--TKT	SDTVCDSDQED	ST-YT-QLWN	88
hNGFR	37	Y-THSGEC--	CKA-CNLGEG	VAQPCGANQT	VCEPCLD-SV	TF-SD-VVSA	79
hFas	49	LEGLHHDGQF	CHKPCPPGER	KARDCTVN-G	DEPDCVPCOE	GKEYT-DKAH	96
*							
OAF065	86	F-QKCKPCLD	-CAVVRNFQ-	KANC SATSDA	ICGDCLP GFY	...	122
hTNFR1	96	L-RHCLSCSK	-CRKEMGQVE	ISSCTVDRDT	VCG-CRKNQY	...	132
hTNFR2	89	WVPECLSCGS	ROSSDQVE--	TQACTREQNR	IC-TCRPGWY	...	125
hNGFR	80	T-EPCKPOTE	-CVGLQSM--	SAPQVEADDA	VC-RCAYGY	...	114
hFas	97	FSSKCRRL	-CDEGHGLEV	EINCTRTQNT	KQ-RCKPNFF	...	134



【書類名】 要約書

【要約】

【構成】 ヒトストローマ細胞株が産生するポリペプチド、その製造方法、そのポリペプチドをコードするDNA、そのDNAからなるベクター、そのベクターで形質転換された宿主細胞、そのポリペプチドの抗体、およびそのペプチドまたは抗体を含有する薬学的組成物。

【効果】 本発明のポリペプチドは造血・免疫・神経系細胞の分化、増殖、成長、生存維持または細胞死に関連した生物活性、免疫系の機能に関連した生物活性、腫瘍の増殖、成長あるいは炎症に関連した生物活性、また骨代謝に関連した生物活性を有していると考えられる。従って、免疫系または神経系もしくは骨代謝の機能の低下または亢進に関する疾患、または造血系細胞の発育不全または異常増殖等の予防または治療薬となることが期待される。

【選択図】 なし

【書類名】

職権訂正データ

【訂正書類】

特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

000185983

【住所又は居所】

大阪府大阪市中央区道修町2丁目1番5号

【氏名又は名称】

小野薬品工業株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】

100081086

【住所又は居所】

東京都中央区日本橋人形町2丁目2番6号 堀口第  
2ビル7階 大家特許事務所

【氏名又は名称】

大家 邦久

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000185983]

1. 変更年月日 1990年 9月 2日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市中央区道修町2丁目1番5号

氏 名 小野薬品工業株式会社